

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

Extrato etanólico das folhas e oleorresina de *Copaifera multijuga* controlam a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR8/SVneo) e em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional

Aryani Felix Fajardo Martínez

Uberlândia
Agosto, 2022

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

Extrato etanólico das folhas e oleorresina de *Copaifera multijuga* controlam a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR8/SVneo) e em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional

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

ARYANI FELIXA FAJARDO MARTÍNEZ

Orientadora: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Coorientador: Dr. Samuel Cota Teixeira

Uberlândia

Agosto, 2022

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

M385
2022 Martinez, Aryani Felix Fajardo, 1993-
 Extrato etanólico das folhas e oleorresina de
Copaifera multijuga controlam a infecção por Toxoplasma
gondii em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo),
extravilosas (HTR8/SVneo) e em vilos coriônicos humanos
de terceiro trimestre gestacional [recurso eletrônico] /
Aryani Felix Fajardo Martinez. - 2022.

Orientadora: Bellisa de Freitas Barbosa.

Coorientadora: Samuel Cota Teixeira Cota Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.539>

Inclui bibliografia.

1. Imunologia. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-,
(Orient.). II. Teixeira, Samuel Cota Teixeira Cota, 1993-
, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
IV. Título.

CDU: 612.017



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, nº 282 do PPGIPA				
Data:	Trinta de agosto de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14 h	Hora de encerramento:	17h e 20min
Matrícula do Discente:	12012IPA005				
Nome do Discente:	Aryani Felixia Fajardo Martinez				
Título do Trabalho:	Extrato etanólico das folhas e oleorresina de <i>Copaifera multijuga</i> controlam a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), extravilosas (HTR8/SVneo) e em vilos coriônicos humanos de terceiro trimestre gestacional				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das Interações entre Patógenos e seus Hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização do Comportamento das Células Trofoblásticas Frente a Transmissão Congênita do <i>Toxoplasma gondii</i>				

Reuniu-se no dia 30 de agosto, às 14 horas, por vídeo conferência, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Rafaela José da Silva - University of Pittsburgh, Pensilvânia/EUA; Letícia de Souza Castro-Filice - FAMED/UFU; Bellisa de Freitas Barbosa - PPGIPA/ICBIM/UFU (Presidente) e orientadora do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Bellisa de Freitas Barbosa, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a). Agradeceu a presença do público e concedeu ao(à) discente a palavra para exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores(as) que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO (A)

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 17:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Letícia de Souza Castro Filice, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafaela José da Silva, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3860426** e o código CRC **EE4337BD**.

Dedicatória

Ao criador de todas as coisas, ao forjador do meu caminho, aquele que me acompanha em todos os momentos, aquele que me deu forças para continuar quando eu estava prestes a cair, portanto, com toda humildade que meu coração puder emanar, dedico este trabalho primeiramente a DEUS.

À minha Querida Vovó Romelia Carrillo (Q.D.D.G.), por seu amor incomparável, ainda me lembro do dia em que este sonho começou, como estava feliz e triste e para acalmá-la disse-lhe que voltaria de férias para ver você, aquelas palavras que você disse ainda me parecem que estou ouvindo, não estarei lá quando você voltar. É por isso que essa conquista vai para o céu por você.

À minha amada mãe Irma Yolanda Martínez por ser o pilar fundamental em tudo o que sou, por seu apoio em todos os momentos na minha vida, porque você não corta minhas asas, pelo contrário, você me ajuda a voar e lutar para realizar meus sonhos, por seus conselhos, seus valores pela motivação constante que você me dá, mas acima de tudo pelo seu amor incondicional.

À minha irmã Sindy Fajardo por ser um exemplo de irmã mais velha, onde sempre estive comigo, você sempre foi meu protetor e meu maior apoio nos momentos difíceis, dando palavras de força e incentivo brindando seu amor incondicional.

Ao meu irmão Lester Sevilla, com amor e carinho.

Agradecimento especial

À minha Querida Orientadora Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, obrigada por me receber de braços abertos e me aceitar como sua aluna. Quero expressar a admiração e respeito que sinto por você. Foi um verdadeiro prazer e orgulho ser aluna de um grande exemplo mulher, uma mentora e profissional excepcional. Sou muito grata pela confiança, orientações, paciência e ensinamentos.

Ao Meu Estimado Co-orientador Dr. Samuel Cota Teixeira, a quem agradecerei infinitamente, você foi a primeira pessoa que me recebeu com muito carinho no laboratório, e da mesma forma com paciência que me ensinou, foi muito agradável de trabalhar e aprender com você. Muito obrigada por estar presente em todos os momentos não só no trabalho, também pessoalmente, se preocupando com meus assuntos, me dando orientações, conselhos e palavras de incentivo. Tenho muito carinho e admiração por você.

Agradecimientos

Agradeço imensamente a DEUS pela vida que ele me dá por seu amor e fidelidade, pois sou tão sortuda e abençoada por você por me dar pessoas especiais onde quer que eu esteja, colocando anjos ao redor da minha vida para cuidar e contribuir para o meu bem-estar e aqueles que contribuem com um grão de areia para o meu crescimento em todos os sentidos.

Agradeço profundamente a minha amada mãe por todo apoio prestado ao longo da minha vida sem você mãe nada disso seria possível, você é meu maior tesouro.

Agradeço aos meus irmãos, meus companheiros de vida, por sempre nos manterem juntos e serem todos por um, e um por todos, seu apoio, amor e lealdade são de extrema importância em minha vida.

Agradeço minha tia Yesenia por me amar como uma filha obrigada tia por me dar seu apoio incondicional.

Sou muito abençoada por ter uma família tão unida, obrigada tias, primos e sobrinhos por comemorarem minhas conquistas, estando presentes nos momentos difíceis.

Agradeço a um ser especial e importante Kelvin Espinoza, a quem Deus colocou em meu caminho desde o dia zero, ele tem sido meu companheiro em todos os momentos. Obrigada por tudo que você fez por mim. Não tenho como pagar sua paciência, apoio, compreensão e companhia. Obrigada por me apoiar nos momentos difíceis e me incentivar a continuar nos momentos de fraqueza. Sua companhia tem sido de grande apoio e suporte durante todo esses anos. Ao seu lado eu sou forte, muito obrigada por contribuir com meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à Professora Dra. Eloisa Amália Viera Ferro pela grande oportunidade de pertencer à sua equipe de laboratório.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de imunofisiologia da reprodução por me acolher e me integrar desde o dia em que cheguei; Guilherme, Joed, Gabriel, Alessandra, Rafaela, Clara, Luana, Guilherme Faria, Pedro, muito obrigada pela disponibilidade e assistência em todos os momentos, pela ajuda, me ensinar sempre que precisei, acima de tudo pelo carinho dispensado a mim, obrigada pelas risadas, momentos de trabalho, confiança e sua companhia.

Agradeço aos estrangeiros que conheci em Uberlândia, obrigada por ser tão especiais por todo apoio e carinho, Yusmaris, Laura, Nelly, Tatiana, Sandro, Marco, David. Obrigada por todos os bons ou maus momentos vividos, estiveram presentes fazendo-me sentir acolhida.

Agradeço aos alunos da Professora Neide pela disposição e ajuda me auxiliando nos momentos que precisei; Laura, Marcos Paulo, Yusmaris, Tatiana, Flavia.

Agradeço às minhas amigas porque mesmo estando tão longe, não foi empecilho para elas estarem presentes nos momentos difíceis e alegres, seja através de mensagem ou ligações, sou muito grata de ter presente a vocês na minha vida ao longo dos anos sua amizade é uma bênção obrigada por estar disposto a me ouvir, me apoiar e me amar. Muito Obrigada Amigas; Jessy, Lixsy, Aurora, Sindy, Lessi, Lorens, Gemelin.

À Universidade Federal de Uberlândia, que foi minha casa de estudos por dois anos e meio e da qual tenho orgulho de me formar.

A OEA por ter me dado a oportunidade de estudar no Brasil.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

OBRIGADA DO FUNDO DO MEU CORAÇÃO, MUITO OBRIGADA!!!!

LISTA DE ABREVIATURAS

- AgNp-Bio-** Nanopartículas de prata biogênicas
- AgNp-** Nanopartículas de prata
- BSA-** Albumina sérica bovina
- COX-2-** Ciclooxigenase-2
- DCF-** 2',7'-diclorofluoresceína
- DHPR-** Dihidrofolato redutase
- DHPS-** Dihidrofolato sintase
- DMSO-** Dimetil sulfóxido
- H₂DCF-DA-** 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
- H₂O₂-** Peroxido de hidrogeno
- IFN- γ -** Interferon gamma
- IgG-** Imunoglobulina G
- IL-** Interleucina
- LHD-** Lactato desidrogenase
- MTT-** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltertrazolina brometo
- MIF-** Fator de inibição da migração de macrófagos
- MCP-1-** Proteína quimiotática de monócitos-1
- NK-** Célula Natural Killer
- NP-** Nanopartículas
- NO-** Óxido nítrico
- PBS-** Solução salina tamponada com fosfato
- PYR-** Pirimetamina
- ROS-** Espécies reativas de oxigênio
- SDS-** Dodecil sulfato de sódio
- SDZ-** Sulfadiazina
- SFB-** Soro fetal bovino
- Th-** Células T auxiliares
- TLRs-** Receptores do tipo Toll

TMB- Tetrametilbenzidina

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Características gerais de <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2	Toxoplasmose congênita	14
1.3	Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	15
1.4	Resposta imune na gestação	16
1.5	Células trofoblásticas humanas: BeWo e HTR8/SVneo	17
1.6	Toxoplasmose – tratamentos convencionais e alternativos	18
1.7	Gênero <i>Copaifera</i>	20
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Cultura de células BeWo e HTR8/Svneo	23
4.2	Coleta das placentas humanas, extração e cultura dos vilos placentários	23
4.3	Cultura de taquizoítos <i>T. gondii</i>	24
4.4	Coleta do extrato etanólico de folhas e oleoresina de <i>C. multijuga</i>	24
4.5	Ensaio de viabilidade celular	25
4.6	Ensaio de invasão e proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR8/Svneo	26
4.7	Ensaio de reversibilidade e reinfecção	26
4.8	Ensaio de adesão de <i>T. gondii</i> : taquizoítos pré-tratados com oleorresina ou extrato etanólico	28
4.9	Ensaio de invasão e proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células infectadas com taquizoítos pré-tratados com oleorresina ou extrato etanólico	29
4.10	Dosagem de citocinas por ELISA	29
4.11	Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células BeWo e HTR8/SVneo	30
4.12	Viabilidade de vilos coriônicos humanos tratados com extrato etanólico e oleorresina	31
4.13	Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em vilos coriônicos humanos	31
4.14	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	33

5.1	Extrato etanólico de folha e oleorresina de <i>C. multijuga</i> alteraram a viabilidade celular apenas em concentrações mais altas	33
5.2	Extrato etanólico de folha e oleorresina reduziram significativamente a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo e HTR8/SVneo	33
5.3	O extrato etanólico e a oleorresina exibiram efeito antiparasitário irreversível.....	33
5.4	O pré-tratamento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> com extrato etanólico e oleorresina alterou adesão, invasão e subsequente proliferação intracelular.....	35
5.5	Extrato etanólico de folhas e oleorresina de <i>C. multijuga</i> regularam positivamente IL-6, e modularam negativamente os níveis de IL-8 em células BeWo.....	36
5.6	Extrato etanólico e oleorresina de <i>C. multijuga</i> modularam a produção de citocinas e ROS em células HTR8/SVneo	37
5.7	Vilos coriônicos humanos tratados com o extrato etanólico e a oleorresina não alteram a viabilidade.....	38
5.8	Extrato etanólico de folhas e oleorresina de <i>C. multijuga</i> controlam a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> e não alteram o perfil de citocinas em vilos coriônicos humanos.....	39
6	DISCUSSÃO	39
7	FIGURAS.....	44
8	Referências bibliográficas.....	63

RESUMO

O tratamento convencional da toxoplasmose congênita tem poucas opções eficazes, mas os mais usados são drogas baseia-se principalmente na combinação de sulfadiazina e pirimetamina. No entanto, a terapia com esses medicamentos está associada a efeitos colaterais graves e resistência, exigindo o estudo de novas estratégias terapêuticas. Atualmente, existem muitos estudos com produtos naturais, incluindo o óleo de *Copaifera*, mostrando ação contra alguns patógenos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*. No presente estudo, investigamos os efeitos do extrato etanólico das folhas e da oleorresina de *Copaifera multijuga* contra *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas vilosas humanas (BeWo) e extravilosas (HTR8/SVneo), bem como em explantes de vilosidades humanas de terceiro trimestre gestacional. Com este propósito, ambas as células e explantes vilosos foram infectados ou não com *T. gondii*, tratados com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga* e analisadas quanto à toxicidade celular, proliferação parasitária, produção de citocinas e ROS. Paralelamente, ambas as células foram infectadas por taquizoítos pré-tratados com extrato etanólico ou oleorresina, e observou-se adesão, invasão e replicação do parasito. Nossos resultados mostraram que o extrato e a oleorresina não desencadearam toxicidade em pequenas concentrações e foram capazes de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células previamente infectadas. Além disso, extrato etanólico e oleorresina demonstraram ação antiparasitária irreversível em células BeWo e HTR8/SVneo. Em seguida, a adesão, invasão e replicação de *T. gondii* foram atenuadas quando células BeWo ou HTR8/SVneo foram infectadas com taquizoítos pré-tratados. Finalmente, células BeWo infectadas e tratadas regularam positivamente a IL-6 e modularam negativamente a IL-8, enquanto as células HTR8/SVneo não alteraram significativamente essas citocinas quando infectadas pelo parasito. Finalmente, o extrato etanólico e a oleorresina reduziram a proliferação de *T. gondii* em explantes de vilosidades humanas, e provavelmente esse efeito é um mecanismo de ação direta sobre os parasitos. Assim, compostos de *C. multijuga* apresentaram diferentes atividades antiparasitárias de forma dependente da população trofoblástica, sendo a ação direta sobre os taquizoítos um mecanismo comum operando em ambas as células. Considerando todos esses parâmetros, o extrato etanólico e a oleorresina de *C. multijuga* podem ser alvos para o estabelecimento de uma nova estratégia terapêutica para a toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose congênita, *Copaifera multijuga*, extrato etanólico, oleorresina.

ABSTRACT

Conventional treatment of congenital toxoplasmosis has few effective options, but the most used are drugs based mainly on the combination of sulfadiazine and pyrimethamine. However, therapy with these drugs is associated with severe side effects and resistance, requiring the study of new therapeutic strategies. Currently, there are many studies with natural products, including *Copaifera* oil, showing action against some pathogens such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. In the present study, we investigated the effects of ethanol extract from leaves and oleoresin of *Copaifera multijuga* against *Toxoplasma gondii* in human villous (BeWo) and extravillous (HTR8/SVneo) trophoblastic cells, as well as in third trimester human villous explants. For this purpose, both cells and villous explants were infected or not with *T. gondii*, treated with ethanol extract or oleoresin from *C. multijuga* and analyzed for cellular toxicity, parasite proliferation, cytokine and ROS production. In parallel, both cells were infected by tachyzoites pre-treated with ethanol extract or oleoresin, and adhesion, invasion and parasite replication were observed. Our results showed that the extract and oleoresin did not trigger toxicity at low concentrations and were able to reduce intracellular proliferation of *T. gondii* in previously infected cells. In addition, ethanol extract and oleoresin demonstrated irreversible antiparasitic action on BeWo and HTR8/SVneo cells. Then, *T. gondii* adhesion, invasion and replication were attenuated when BeWo or HTR8/SVneo cells were infected with pre-treated tachyzoites. Finally, infected and treated BeWo cells up-regulated IL-6 and down-modulated IL-8, while HTR8/SVneo cells did not significantly alter these cytokines when infected by the parasite. Finally, the ethanol extract and oleoresin reduced the proliferation of *T. gondii* in human villi explants, and this effect is probably a direct mechanism of action on the parasites. Thus, compounds from *C. multijuga* showed different antiparasitic activities in a trophoblastic population-dependent manner, with the direct action on tachyzoites being a common mechanism operating in both cells. Considering all these parameters, the ethanolic extract and the oleoresin from *C. multijuga* can be targets for the establishment of a new therapeutic strategy for congenital toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, congenital toxoplasmosis, *Copaifera multijuga*, ethanolic extract, oleoresin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, sendo responsável por morbidades graves, principalmente relacionado com pessoas imunocomprometidas (BLADER et al., 2015; ZHANG, SHIUN LAI, JUHAS, 2019). Taquizoítos de *T. gondii* apresentam uma forma alongada e suas extremidades arqueadas, lembrando o formato de meia lua. Em sua região anterior, possui o complexo apical, uma organela em forma de cone oco, e possui três anéis de micro túbulos, além das micronemas e roptrias (BLADER et al., 2015). Essas organelas, bem como os grânulos densos, são importantes no processo de adesão e invasão das células hospedeira e manutenção do parasito no interior das mesmas em seu vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS, 2002; BLADER et al., 2015; TARDIEUX; BAUM, 2016).

A infecção por *T. gondii* pode ocorrer através da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais do parasito, ou pode se dar também através de contato direto com fezes de felinos infectados, ou por meio do consumo de alimentos e água contaminados com oocistos (BIGNA, et al., 2019). Após a ingestão, os cistos contendo bradizoítos ou oocistos cheios de esporozoítos são rompidos no estômago, liberando então os parasitos que infectarão o intestino delgado e se converterão em taquizoítos, ocasionando a liberação de células inflamatórias e estas infectadas servirão como um ambiente para a proliferação de *T. gondii* (BAPTISTA et. al., 2019). Assim, durante a infecção são formados cistos no tecido nervoso e nos músculos, culminando na cronificação da doença (MARTIN et al., 2015).

O ciclo de vida de *T. gondii* inclui uma fase assexuada e sexuada, tendo como hospedeiros definitivos os felídeos dos gêneros *Felis* e *Lynx*, e hospedeiros intermediários as aves e mamíferos, incluindo o homem (DUBEY, 1998; DUBEY, 2020). A fase sexuada, que ocorre nos hospedeiros definitivos, começa quando ocorre a ingestão de cistos contendo bradizoítos pelos felinos, levando a liberação de parasitos na mucosa gástrica que migram para o epitélio intestinal, onde se replicam por esquizogonia e formam esquizontes. O núcleo dos esquizontes inicia lentamente sua individualização através da divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos. Estes, por sua vez, dão origem aos gametas, e havendo fecundação, formam-se oocistos. Após cair na luz intestinal, os oocistos são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais. A ingestão de alimentos contaminados, tanto com cistos quanto com oocistos, pode levar a infecção de hospedeiros intermediários, pois estes

liberam bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, que em seguida vão se transformar em taquizoítos capazes de invadir e se disseminar pelas células do indivíduo, ocorrendo a fase assexuada (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014; AL-MALKI, 2021). Para os seres humanos, as vias mais importantes de transmissão são através da ingestão de carne mal cozida contendo cistos, vegetais mal lavados, água ou solo contaminado com oocistos e via transmissão vertical, ou seja, da mãe para o feto ou embrião (TONG et al., 2021).

1.2 Toxoplasmose congênita

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

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

Os sintomas da toxoplasmose congênita incluem a coriorretinite, hidrocefalia, microcefalia, epilepsia, cegueira, estrabismo, calcificações intracranianas, abortos, natimortos, entre outros sintomas (JONES; LOPES; WILSON, 2003; LI et al., 2014). Geralmente, bebês infectados no terceiro trimestre são assintomáticos, mas pode apresentar sintomas durante a

infância ou na fase adulta (WALLON et al., 2001; MONCADA; MONTOYA, 2012; SCHLUTER; BARRAGAN, 2019).

1.3 Resposta imune contra *T. gondii*

A invasão por *T. gondii* em células do hospedeiro mamífero desencadeia respostas do sistema imune inato e adaptativo, o que acarreta resistência e proteção a longo prazo. A infecção por *T. gondii* provoca uma resposta imunológica do tipo Th1, com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias que protegem o hospedeiro contra o parasito (HUNTER; SIBLEY, 2012). Receptores do tipo *Toll* (TLRs) são significativos na resposta imune inata, pois são capazes de reconhecer ligantes expressos pelo parasito (YAROVINSKY et al., 2014). A interação de *T. gondii* com esses receptores induz a produção de interleucina-12 (IL-12) pelas células da imunidade inata do hospedeiro, como células *natural killer* (NK), células dendríticas e macrófagos (YAROVINSKY et al., 2014). Dentre as funções de IL-12 está a indução da produção de interferon (IFN)- γ (MA et al., 2015). O IFN- γ está relacionado com vários mecanismos intracelulares para inibir a replicação e eliminar o parasito (DUPONT et al., 2012; YAROVINSKY, 2014). Esta citocina favorece a conversão de taquizoítos em bradizoítos e, ao mesmo tempo, previne a ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reagudização da infecção no hospedeiro (MILLER et al., 2009).

Outra citocina, o fator de necrose tumoral (TNF)- α , é produzida por macrófagos, neutrófilos, células T e células dendríticas que proporcionam o aumento da capacidade microbicida de macrófagos e induz células NKs a produzirem IFN- γ (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; KÖNER et al., 2010). A resposta secundária (imunidade adquirida) que acontece logo após a resposta inicial, é considerada mediada por células, pois apresenta atividade de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Podemos observar também que em pacientes imunocomprometidos ocorre a ativação de macrófagos, células NKs, linfócitos T e leucócitos polimorfonucleares (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; SILVA; LANGONI, 2009).

Além do IFN- γ e da IL-12, outras citocinas pró-inflamatórias são importantes no combate a infecção por *T. gondii*, como a IL-6, IL-8, fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), (SILVA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2020; COSTA et al., 2021). IL-6, TNF e MIF são as citocinas mais importantes envolvidas na resposta imune ao *T. gondii* em células trofoblásticas humanas, explantes humanos de terceiro trimestre e interface materno-fetal murina, permitindo redução significativa na transmissão vertical do parasito (BARBOSA et al.,

2015; SILVA et al., 2017; GOMES et al., 2018). IL-6 é um importante citocina envolvida no controle do *T. gondii* em vários tipos celulares, como macrófagos e monócitos (PEREIRA et al., 2019) e trofoblastos humanos e murinos (BARBOSA et al., 2014; BARBOSA et al., 2015; SILVA et al., 2017; GOMES et al., 2018).

MIF é liberado por macrófagos ativador por vários estímulos pró inflamatórios tais como lipopolisacarídeos síndrome de choque toxénico por toxina-1 IFN- γ e (TNF)- α , (MARTINEY et al., 2000). Alguns trabalhos publicados nos últimos anos do nosso grupo de pesquisa mostraram o importante papel de MIF nos processos inflamatórios e no controle da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal, especialmente em células trofoblásticas humanas (FRANCO et al., 2011; GOMES et al., 2011; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2014, SILVA et al., 2017). Tem estudos que mostram que na infecção por *T. gondii*, o MIF pode causar a produção de IL-8 a partir de células mononucleares do sangue periférico humano ao mesmo tempo em que ativa as vias ERK MAPK em macrófagos derivados da medula óssea murina. Reconhecendo que o MIF pode desempenhar um papel imunomodulador durante a infecção por *T. gondii* em mamíferos. (SOMMERVILLE et al., 2013). A IL-8 é um membro da família de quimiocinas CXC e é um importante mediador durante a resposta imune inata contra vários patógenos (DONG et al., 2015). Além disso, foi relatada a produção de IL-8 a partir de fibroblastos e células HeLa de células infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (DENNEY et al., 1999). Significativamente, foi observado que nos estágios agudos da infecção por *T. gondii* há um rápido recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (DENKERS et al., 2004), e isso tem se mostrado essencial para a resolução da infecção.

1.4 Resposta imune na gestação

A gestação é considerada como um processo pro-inflamatório e inflamatório, essas fases podem ser observadas de formas distintas nas três fases da gestação: início, meio e fim. No início, observa-se um processo pró-inflamatório com a presença de citocinas e quimiocinas como IL-8 e proteína quimioatraente de monócito (MCP) -1. Na metade da gestação, observa-se uma diminuição significativa dos níveis dessas citocinas que voltam a subir no final do processo gestacional (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

Na fase de implantação do embrião, o trofoblasto quebra o revestimento epitelial do útero para garantir a adesão e invasão do tecido endometrial, além de proporcionar a substituição da musculatura lisa espiral dos vasos responsáveis pelo fornecimento adequado de sangue para o feto ocasionando uma forte resposta inflamatória, sendo observado, nesse caso,

um perfil imunológico do tipo Th1 (KODA; ALDO; MOR 2009). As citocinas e os fatores de crescimento aparecem como moléculas-chaves na regulação de trofoblastos. São observados cerca de 27 tipos diferentes, entre eles: interleucina (IL)-1 β , IL-5, IL-6, IL8, MCP-1; podemos identificar nesse caso um perfil imunológico do tipo Th1 (SHARMA, GODBOLE, MODI, 2016).

Para garantir uma gestação até o final é importante que exista um balanço entre perfil imunológico Th1 e Th2, sendo preferencialmente Th2 do segundo ao terceiro trimestres (KOGA; ALDO; MOR 2009). Assim, a infecção por *T. gondii* durante a gestação pode alterar esse balanço, levando a complicações. A infecção por *T. gondii* pode acontecer em qualquer estágio gestacional, porém as variadas consequências clínicas estão relacionadas com o trimestre em que a gestante se encontra. As implicações fetais mais importantes ocorrem quando acontecem no primeiro trimestre, podendo ocasionar aborto, natimorto ou alterações neurológicas graves. A transmissão congênita do parasito no terceiro trimestre ocorre com maior frequência, porém com apresentações de quadro patológico menos grave e a diminuição do risco de aborto (HAMPTON et al., 2015).

1.5 Células trofoblasticas humanas: BeWo e HTR8/SVneo

O trofoblasto atua como barreira de proteção entre a circulação fetal e materna e é de suma importância para a manutenção da gestação até seu final. É responsável também pela ruptura da barreira do epitélio endometrial, nutrição do embrião e regulação hormonal (KOGA; ALDO; MOR 2009; POLLHEIMER; KNÖFLER 2018.) Durante o processo de implantação, esse trofoblasto se diferencia em duas subpopulações: o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto (MOORE et al., 1993; CEBALLOS-POMARES et al., 2017). O sinciciotrofoblasto é uma camada multinucleada que forma a superfície externa dos vilos placentários e entra em contato direto com o sangue materno, sendo formado a partir de células do citotrofoblasto (HUPPERTZ; GAUSTER, 2011; MAYHEW, 2014). O citotrofoblasto é formado por células individualizadas, com alta capacidade proliferativa e são divididas em: trofoblasto viloso e extraviloso. O trofoblasto viloso é importante para a troca de nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto, enquanto que o trofoblasto extraviloso é responsável pela migração e invasão na decídua (MIDGLEY et al., 1963; APLIN, 1991). Portanto, o trofoblasto é uma importante barreira física que precisa ser mantida intacta a fim de proteger o organismo contra o ataque de patógenos (LIEMPI et al., 2014). Vários estudos buscam entender o papel dos trofoblastos na

resposta imune durante a gravidez, principalmente na presença de *T. gondii* com a utilização de linhagens de células trofoblásticas, por exemplo células BeWo e HTR-8/Svneo, as quais apresentam propriedades semelhantes ao trofoblasto primário. Essas células são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii* e apresentam uma produção de progesterona semelhantes às células trofoblásticas de primeiro trimestre, por isso são consideradas ótimas para o estudo da relação materno-fetal. Células BeWo foram isolados de um coriocarcinoma humano em 1968 por Pattillo e Gey. Essas células possuem muitas características de trofoblasto humano, pois secretam hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), progesterona e estradiol (WOLFE, 2006). Células HTR-8/SVneo foram geradas a partir de isolados de trofoblasto extraviloso de placentas de primeiro trimestre. Posteriormente, elas foram transfectadas com um plasmídeo contendo o antígeno T do vírus símio 40 (SV40) (GRAHAM et al., 1993). Células BeWo são representantes de trofoblasto viloso humano, enquanto que células HTR8/SVneo são representantes de trofoblasto extraviloso humano (BARBOSA et al., 2008; FRANCO et al., 2011; DA SILVA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2020; DE SOUZA et al., 2021).

1.6 Toxoplasmose – tratamentos convencionais e alternativos

A toxoplasmose é considerada um problema de saúde mundial com cerca de 1 bilhão de pessoas infectadas com *T. gondii* e a prevalência da patologia pode chegar a 71,5% (AHMADPOUR et al., 2019). Com relação ao tratamento, a primeira droga de escolha é a pirimetamina, bem como a sulfadiazina ou a combinação de ambas (ABUGRI, JAYNES, WITOLA, 2019). A combinação dessas drogas demonstra notável atividade sinérgica contra a replicação do taquizoito por meio da inibição sequencial dihidropteroato sintase do parasito (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR). Essas duas enzimas principais são responsáveis pela síntese de compostos de folato essenciais para a sobrevivência e replicação do parasito (BARBOSA et al., 2015).

Os tratamentos para toxoplasmose congênita são escassos no momento. Quando a transmissão fetal não é confirmada, o antibiótico espiramicina é usado para prevenir a transmissão vertical (PEYRON et al., 2017), uma vez que esse macrolídeo não é transplacentário (MONTOYA E REMINGTON, 2008). Quando a infecção fetal é confirmada, e pode ser sintomática para toxoplasmose, a escolha do tratamento é a combinação de pirimetamina com sulfadiazina (DUNAY et al., 2018). No entanto, essas drogas não são bem toleradas pelo organismo, interagindo indistintamente com os processos bioquímicos do

parasito e do hospedeiro (SEPÚLVEDA-ARIAS et al., 2014), apresentando efeitos adversos, como supressão da medula óssea, causando anemia megaloblástica, leucopenia e granulocitopenia (PETERSON et al., 2007). Por essa razão, vários estudos têm proposto a utilização de tratamentos alternativos para a toxoplasmose.

Neste cenário, o estudo de nanopartículas (NP) tem sido investigado. As principais características das NP são a baixa toxicidade, modulação da farmacocinética, aumento da biodisponibilidade e a possibilidade de transportar componentes farmacológicos, o que também permite que o medicamento seja entregue diretamente ao alvo específico (KHALIL et al., 2013; TORRES-SANTIAGO et al., 2016). NP com inserções de prata em sua estrutura, chamadas de nanopartículas de prata (AgNp), são utilizadas para aplicações na saúde porque possuem atividades antimicrobianas e antiinflamatórias (SHRIVASTAVA et al., 2007; POURALI E YAHYAEI, 2016; SCANDORIEIRO et al., 2016). Um trabalho recente de nanopartículas de prata biogênicas (AgNp-Bio) demonstrou a capacidade de reduzir a proliferação de *T. gondii* com a indução de mediadores inflamatórios nas células BeWo e HTR8/SVneo e independente de mediadores em vilos coriônicos. Assim, o uso de AgNp-Bio no tratamento da toxoplasmose em modelos de células BeWo e HTR-8/Svneo e em vilos coriônicos é considerado promissor (COSTA et al., 2021).

Além do uso de NP, estudos envolvendo o uso de azitromicina têm se apresentado promissor no controle da transmissão vertical de *T. gondii* em roedores *Calomys callosus* (COSTA et al., 2009) e em células de trofoblasto humano (linhagem BeWo) (FRANCO et al., 2011), demonstrando o importante efeito protetor da azitromicina contra esse parasito na interface materno-fetal. Além disso, em explantes de vilosidades humanas do terceiro trimestre de gestação infectados com *T. gondii*, o tratamento com azitromicina foi capaz de controlar a replicação dos taquizoítos da cepa RH (FRANCO et al., 2019). Outro trabalho realizado avaliou a eficácia da enrofloxacin e do toltrazuril no controle da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) e em explantes de vilosidades humanas de terceiro trimestre. Os resultados mostraram que a enrofloxacin e o toltrazuril foram capazes de controlar a proliferação do parasito, e suas eficiências foram relacionados à regulação positiva de IL-6 e MIF, e uma ação direta sobre os parasitos. Portanto, enrofloxacin e toltrazuril podem ser estratégias alternativas para prevenir ou tratar a toxoplasmose congênita (SILVA et al., 2017). Devido aos problemas causados pelos tratamentos convencionais e pelo fato de alguns não combaterem certas formas do parasito, a busca por drogas alternativas é extremamente necessária.

1.7 Gênero *Copaifera*

As plantas do gênero *Copaifera*, também conhecidas popularmente como copaíba ou pau d'óleo, pertencem à família Fabaceae (Leguminosae), e os representantes deste gênero encontram-se principalmente no continente americano e africano (VEIGA JUNIOR, et al., 2002). Do tronco das espécies de *Copaifera* spp. é possível extrair o oleorresina, o qual provém de canais secretores formados pela dilatação de espaços intercelulares, localizados em todas as partes da árvore. Ele pode ser obtido através da perfuração no tronco da copaíba, utilizando um trado, onde posteriormente insere-se um cano PVC no orifício e o óleo escoar (VEIGA JUNIOR, et al., 2002; PIERI, F. A. et al., 2009). O oleorresina 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, et al., 2000). As oleorresinas de copaíba possuem sesquiterpenos e diterpenos e como principal composto β -Cariofileno e tem propriedades cicatrizantes e antissépticas, além de serem consideradas anti-inflamatório e antibiótico (IZUME et al., 2013; SOUZA, 2017).

Este gênero é amplamente estudado devido às suas propriedades anti-inflamatórias, como diminuição da migração de leucócitos, além de inibirem a histamina e serotonina (RODRIGUES et al., 2018).

Algumas espécies de copaíba e sua ação contra *T. gondii* foram estudadas por (TEIXEIRA et al., 2020). Neste estudo, os autores demonstraram que o oleorresina de *C. reticulata*, *C. duckei*, *C. paupera* e *C. pubiflora* foram capazes de controlar a infecção por *T. gondii* através de modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo*. Segundo os autores, os efeitos anti-*T. gondii* causados por essas oleorresinas provavelmente estão relacionados à imunomodulação das células do hospedeiro, bem como ao efeito direto sobre os parasitos (TEIXEIRA et al., 2020). Assim, tomados em conjunto, a literatura científica fornece evidências do potencial das oleorresinas serem uma fonte alternativa para o tratamento de toxoplasmose congênita pela redução da taxa de proliferação de *T. gondii* com baixos efeitos de citotoxicidade para as células do hospedeiro (TEIXEIRA et al., 2020).

Na literatura existem outros estudos que demonstram a ação dos efeitos antiparasitários da *Copaifera* contra o *T. cruzi*. (KIAN et al., 2018), mostraram a capacidade do óleo de copaíba e ácido carurenóico em eliminar as formas de *T. cruzi* em macrófagos infectados, a atividade antimicrobiana que esses compostos apresentaram foi provavelmente devido a sua ação direta sobre os parasitos. (IZUMI et al., 2013) avaliaram a atividade de oito espécies de oleorresina

de copaíba contra *T. cruzi*, incluindo observações de efeitos citotóxicos em células de mamíferos e células de parasitos. Demonstrando que todas as oleorresinas de *Copaifera* exerceram efeitos em todas as fases de vida do parasito, principalmente contra as formas replicativas. *Copaifera martii* e *Copaifera officinalis* apresentaram a melhor atividade.

Da mesma forma, existem estudos que demonstram a ação do gênero *Copaifera* contra a Leishmaniose. Um trabalho de (DHORM PIMENTEL et al., 2018) usando nanoemulsões como sistema de administração de óleos de copaíba e andiroba (nanocopa e nanoandi) e seus efeitos antiparasitários sobre *Leishmania infantum* e *L. amazonensis*, seus resultados demonstraram uma atividade tóxica de nanocopa e nanoandi contra a promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania* e reduzindo os níveis de infecção (tamanho da lesão, carga parasitária e histopatologia). (SANTOS et al., 2008). Avaliaram oito tipos diferentes de óleos de *Copaifera* quanto à sua atividade antileishmania. Para avaliar a taxa de sobrevivência peritoneal, macrófagos foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*, os resultados mostraram que todos os óleos apresentaram níveis variáveis de atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis*. Em base a estudos anteriores (SANTOS et al., 2012). Avalia os câmbios morfológicos e ultraestruturais provocados pelo óleo de *Copaifera* em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, causando um dano mitocondrial extensa e também levou á desnaturação da membrana plasmática. A análise morfológica e ultraestrutural demonstra que o tratamento com óleo de *Copaifera* induz alterações na membrana e na mitocôndria dos parasitos. Demonstrando uma vez o potencial antiparasitário que representa este gênero sobre a *L. amazonensis*.

Uma das espécies da copaíba é a *Copaifera multijuga*, encontrada na Amazônia. Ela tem sido estudada devido às suas várias propriedades, onde o mais expressivo é a anti-inflamatória, além de propriedades anti-carcinogênica, e antimicrobiana (antisséptica) (PINHEIRO et al., 2017). Entretanto, não há nada na literatura científica até o momento sobre sua influência na infecção por *T. gondii* em modelos de interface materno-fetal humana.

2 JUSTIFICATIVA

A transmissão de *T. gondii* pode ocorrer de formas diferentes, porém pode-se considerar que a vertical é a mais grave devido às consequências que ela leva, como por exemplo o aborto e as más formações fetais (BARBARESCO et al., 2014). Na gestação, o sistema imune modula, através da participação preponderante das células trofoblásticas, um perfil imune materno para que ocorra a manutenção da gestação.

As drogas do uso terapêutico têm efeitos colaterais graves, como neutropenia, leucopenia, diminuição severa da contagem de plaquetas, trombocitopenia e reações de hipersensibilidade (RAJAPAKSE et al., 2013; MONTAZERI et al., 2018., DURLACH et al., 2021). Além disso, essas drogas também estão associadas a algumas reações raras, como agranulocitose, síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica e necrose hepática, que podem ser fatais em pacientes com toxoplasmose (MCLEOD et al., 2012). Portanto, é fundamental estabelecer um esquema terapêutico, para isso é necessário estudos onde se concentra em encontrar medicamentos seguros com novos mecanismos de ação para a toxoplasmose que sejam eficazes e não tóxicos para os pacientes. Considerando que a toxoplasmose é um problema de saúde pública e que não existem tratamentos eficazes e sem efeitos colaterais indesejáveis, o estudo de tratamentos alternativos é necessário para o possível estabelecimento de futuras drogas preventivas e terapêuticas. Assim, o presente trabalho visa compreender os efeitos do extrato etanólico e oleorresina de *C. multijuga* na infecção experimental por *T. gondii* de células trofoblásticas humana vilosas (BeWo), extravilosas (HTR8/SVneo), e em explantes vilosos humanos de terceiro trimestre gestacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a ação *in vitro* e *ex vivo* do oleorresina e extrato etanólico de folhas de *C. multijuga* em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo), extravilosas (linhagem HTR8/Svneo), e em explantes vilosos humanos de terceiro trimestre gestacional frente à infecção por *T. gondii*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade de células BeWo, HTR8/Svneo e vilos placentários frente aos tratamentos com oleorresina e extrato etanólico de folhas de *C. multijuga*, visando a determinação de concentrações não citotóxicas para realização dos ensaios de parasitismo;
- Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) nas células BeWo, HTR-8/Svneo e vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional tratados ou não com concentrações não tóxicas do oleorresina e extrato etanólico de folhas de *C. multijuga*;
- Verificar a produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células BeWo, HTR-8/Svneo e vilos placentários humanos infectados ou não com *T. gondii* e tratados ou não com o oleorresina e extrato etanólico de folhas de *C. multijuga*;;
- Determinar a adesão, invasão e proliferação intracelular de taquizoítos de *T. gondii* previamente tratados ou não com o oleorresina e extrato etanólico de folhas de *C. multijuga* em células BeWo e HTR8/SVneo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células BeWo e HTR8/Svneo

Células da linhagem BeWo foram obtidas do American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Células HTR8/SVneo (originadas do citotrofoblasto extraviloso humano) foram gentilmente cedidas pela Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil. As células foram mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia. Foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de 75cm² contendo meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com antibióticos (Sigma Chemical CO. St. Luis, USA) e soro fetal bovino (10%) (Cultilab) e incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C (BARBOSA et al., 2008).

4.2 Coleta das placentas humanas, extração e cultura dos vilos placentários

Placentas humanas a termo (N = 2) foram adquiridas de pacientes gestantes após parto cesárea (36 a 40 semanas de gravidez) no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de

Uberlândia (HC-UFU), MG, Brasil. Os critérios de exclusão foram: evidências de pré-eclâmpsia, hipertensão, doença cardíaca, diabetes, doenças infecciosas como toxoplasmose e outras manifestações que pudessem interferir nos resultados esperados.

Após a coleta, o tecido placentário foi encaminhado imediatamente para o laboratório e lavado com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) para remoção do excesso de sangue, seguido de dissecação do tecido endometrial até 1 h após a coleta. Os vilos placentários terminais flutuantes (volume aproximado de 10 mm³) foram coletados e colocados em placas de 96 poços (um por poço) e cultivadas em 200 µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Sigma) por 24 h a 37 ° C e 5% de CO₂ para posteriores ensaios (DE OLIVEIRA GOMES et al., 2011; CASTRO FILICE et al., 2014, DA SILVA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2021, COSTA et al., 2021).

O presente protocolo de pesquisa com amostras de tecido humano foi realizado de acordo com as diretrizes e regulamentações pertinentes, e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil, com o número de aprovação 3.679.426. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes e/ou seus responsáveis legais.

4.3 Cultura de taquizoítos *T. gondii*

Os taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, clone 2F1) expressando constitutivamente o gene da β-galactosidase foram mantidos por passagens seriadas em células BeWo cultivadas em meio contendo 2% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C e 5% de CO₂ (TEIXEIRA et al., 2020).

4.4 Coleta do extrato etanólico de folhas e oleoresina de *C. multijuga*

As amostras de oleoresina e extrato etanólico de folhas de *C. multijuga* foram cedidas pelo Professor Doutor Carlos Henrique Gomes Martins do Departamento de Microbiologia (DEMIC), Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil. A autorização para a realização de estudos científicos com espécies vegetais da biodiversidade brasileira foi solicitada ao Conselho de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SIBIO/ICMBio/MMA/BRASIL) e Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA/BRASIL). As autorizações para realizar atividades de pesquisa com

essas plantas foram emitidas sob os números 35143-1 e 010225/2014-5, respectivamente. A oleorresina autêntica foi coletada na região Norte, no estado do Amazonas, na cidade de Manacapuru, por meio da perfuração dos troncos das árvores com uma broca de 2". Os exsudatos removidos foram armazenados em frascos de vidro. Todo o material vegetal coletado foi identificado por Silvane Tavares Rodrigues no Herbário IAN (EMBRAPA Amazônia Oriental), Milton Groppo Junior no Herbário SPFR (Universidade de São Paulo, USP, Brasil) e Haroldo Cavalcante de Lima no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) por comparação direta com comprovantes autênticos de herbário, dos quais um certificado de identidade taxonômica está disponível mediante solicitação. A amostra de oleorresina foi filtrada através de um filtro sintético de 25m e armazenada a 15°C até a análise.

4.5 Ensaio de viabilidade celular

Verificamos a toxicidade dos compostos extrato etanólico e oleoresina nas células BeWo e HTR8/SVneo. Para tanto, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltertrazolina brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mossman (MOSMANN, 1983). Células BeWo (3×10^4 células/poço/200 μ L) e HTR8/SVneo ($1,5 \times 10^4$ células/poço/200 μ L) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h em meio RPMI 1640 com 10% de SFB a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram tratadas em diluições seriadas com concentrações de (4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 mg/mL) de oleorresina ou extrato etanólico de *C. multijuga* em meio com 10% de SFB por 24 h. Em paralelo, ambas as células foram tratadas com DMSO (0,8%), percentual utilizado para obter maior diluição tanto para oleorresina quanto para extrato etanólico. Como controle, as células não foram tratadas e receberam apenas meio de cultura. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e as células incubadas com 10 μ L de MTT (5 mg/mL) mais 90 μ L de meio RPMI 10% SFB por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. Cristais de formazan resultantes do metabolismo celular foram solubilizados pela adição de uma solução contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) e 50% de N,N-dimetilformamida (Sigma) por 30 min (MOSMANN, 1983). As densidades óticas foram medidas a 570 nm em um leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os dados foram expressos como a porcentagem de células viáveis (% de viabilidade celular) em comparação com células não tratadas (100% de viabilidade celular). Três experimentos independentes foram realizados em oito repetições.

4.6 Ensaio de invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR8/Svneo

Selecionamos diferentes concentrações não tóxicas de oleorresina e extrato etanólico de *C. multijuga* após ensaio de MTT e testamos seu efeito no crescimento de *T. gondii*. As células BeWo (3×10^4 células/poço/200 μL) e HTR8/SVneo ($1,5 \times 10^4$ células/poço/200 μL) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h em meio RPMI 1640 com 10% de SBF a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, ambas as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1 (3 parasitos para 1 célula). Após 3 h, o meio foi descartado, os parasitos extracelulares foram retirados por lavagem com meio incompleto (sem SFB) e as células foram tratadas com concentrações não tóxicas de oleorresinas ou extratos etanólicos de *C. multijuga* por mais 24 h a 37°C e 5% de CO₂ da seguinte forma: para células BeWo, 4 a 16 $\mu\text{g/mL}$; e para células HTR8/SVneo, 4 a 16 $\mu\text{g/mL}$. Sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PYR: 200 + 8 $\mu\text{g/mL}$ para BeWo; 100 + 4 $\mu\text{g/mL}$ para HTR8/SVneo) foi usado como controle positivo (DA SILVA et al., 2017). Células BeWo ou HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii* e não tratadas foram utilizadas como controles negativos. Após 24 h de tratamento, os sobrenadantes da cultura foram coletados e armazenados a -80°C para posterior medição de citocinas. Em paralelo, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase (SILVA et al., 2017; DE SOUZA et al., 2021).

Quantificamos a proliferação intracelular de *T. gondii* e calculamos o número de taquizoítos em comparação com uma curva padrão contendo taquizoítos livres (1×10^6 a 15.625×10^3 parasitos). Células infectadas BeWo ou HTR8/SVneo tratadas apenas com meio (controle negativo) representaram crescimento de parasitas não inibido. Calculou-se a média de células não tratadas (meio) que correspondeu a 100% de proliferação de *T. gondii*. Em seguida, todos os valores sobre o número de taquizoítos obtidos de todos os tratamentos e células não tratadas foram comparados a 100%, e os dados demonstraram em % de proliferação de *T. gondii*. Três experimentos independentes foram realizados em oito repetições.

4.7 Ensaios de reversibilidade e reinfecção

Para avaliar a manutenção dos efeitos antiparasitários de oleorresina e extrato etanólico no crescimento de *T. gondii*, primeiramente realizamos o teste de reversibilidade (TEIXEIRA et al., 2020). Resumidamente, células BeWo (3×10^4 células/poço/200 μL) ou HTR8/Svneo ($1,5 \times 10^4$ células/poço/200 μL) foram semeadas em placas de 96 poços como descrito acima.

Após 24 h em cultura, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (3:1) por 3 h, lavadas para remover parasitos extracelulares e tratadas em duas condições: (1) células BeWo foram tratadas com oleorresina ou extrato etanólico (ambos 16 ou 32 µg/mL), as células HTR8/Svneo foram tratadas com oleorresina ou extrato etanólico (ambos 8 ou 16 µg/mL), ou ambas as células receberam SDZ + PYR (controle positivo) ou apenas meio (controle negativo), depois a proliferação intracelular de taquizoítas foi realizada após 24 h; (2) células e parasitas foram cultivados nas mesmas condições descritas anteriormente (1), mas após 24 h de tratamento, as células foram lavadas, e incubadas com meio livre de tratamentos, e os parasitos deixados crescer por mais 24 h. Em ambas as situações, quantificamos a proliferação de *T. gondii* usando o ensaio de β-galactosidase como mencionado acima. Finalmente, medimos a taxa de reversibilidade percentual (reversibilidade do tratamento %) às 24 h após a remoção do tratamento em comparação com o grupo não tratado (considerado como 100% de reversibilidade) e a condição de tratamento correspondente às 24 h de tratamento (linha de base para comparação). Três experimentos independentes foram realizados em oito repetições.

Para corroborar os dados de reversibilidade, investigamos se o tratamento com oleorresina ou extrato etanólico em células infectadas BeWo e HTR8/SVneo interferiria na capacidade desses parasitos de invadir e replicar dentro de novas células. Resumidamente, células BeWo e HTR8/SVneo foram semeadas a $1,0 \times 10^6$ células/poço em placas de 6 poços. Após 24 h, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (3:1) por 3 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, tratamos as células com oleorresina ou extrato etanólico a 16 ou 32 µg/mL para BeWo; ou 8 ou 16 µg/mL para HTR8/SVneo. SDZ + PYR ou apenas meio foram adicionados como controles. Após 24 h, coletamos os parasitos intracelulares de células infectadas por múltiplas passagens através de uma agulha de calibre 21 e 26. Finalmente, os taquizoítos de *T. gondii* de cada condição experimental foram então deixados reinfestar as monocamadas de células BeWo (3×10^4 células/poço/200 µL) e HTR8/SVneo ($1,5 \times 10^4$ células/poço/200 µL) previamente semeadas em placa de 96 poços. A capacidade de infectar as células foi analisada após 3 h, quando o ensaio de β-galactosidase foi utilizado para quantificar o número total de taquizoítos (% de invasão de *T. gondii*), conforme descrito acima. Três experimentos independentes foram realizados em oito replicatas.

4.8 Ensaio de adesão de *T. gondii*: taquizoítos pré-tratados com oleorresina ou extrato etanólico

O teste de adesão de taquizoítas de *T. gondii* foi realizado, de acordo com trabalhos prévios (OLIVEIRA, et al., 2006; BORGES, et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2020). As células foram semeadas a uma densidade de $1,0 \times 10^5$ (BeWo) e $6,0 \times 10^4$ (HTR8/SVneo) em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de vidro de 13 mm em cada poço. As células foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 30 min, e então lavadas três vezes com PBS 1x. Posteriormente, taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 h com oleorresina, extrato etanólico ou SDZ + PYR. Taquizoítos pré-tratados com 16 ou 32 µg/ml de oleorresina ou extrato etanólico foram usados para aderir as células BeWo; enquanto parasitos pré-incubados com 8 ou 16 µg/ml de oleorresina ou extrato etanólico foram usados para aderir as células HTR8/SVneo. SDZ + PYR (200 + 8 µg/mL para adesão posterior em BeWo, ou 100 + 4 µg/mL para adesão posterior em HTR8/SVneo), ou apenas meio foram usados como controles. Os taquizoítos pré-tratados por 1 h, conforme descrito acima, foram lavados, ressuspensos em meio na ausência de tratamentos e deixados aderir por 3 h às células previamente fixadas. Subsequentemente, as lamínulas foram incubadas *overnight* com anticorpo anti-*T. gondii* monoclonal primário [SAG1/p30] (Abcam TP3 #ab8313) (diluído 1:500 em solução de saponina PGN-0,01%). No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x e incubadas com anticorpo IgG anti-camundongo conjugado Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA # A11001) (diluído 1:500 em solução de PGN-0,01% + saponina), faloidina conjugada com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma, P1951) (diluído 1:50 em PGN + saponina) e TOPRO-3 (diluído 1:500 em PGN+saponina) por 1 h no escuro a temperatura ambiente para marcar taquizoítos, F-actina e núcleos, respectivamente. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com auxílio de glicerol + PPD, e as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha) com um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 200 M). Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de células BeWo e HTR8/SVneo com taquizoítos aderidos e o número total de taquizoítos aderidos por célula em um total de 20 campos escolhidos aleatoriamente. Dois experimentos independentes foram realizados.

4.9 Ensaio de invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células infectadas com taquizoítos pré-tratados com oleorresina ou extrato etanólico

Após verificar a adesão de parasitos pré-tratados em células BeWo e HTR8/SVneo, também investigamos a replicação intracelular e invasão de parasitos pré-tratados com oleorresinas ou extrato etanólico (CASTANHEIRA, et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2020). Taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 h a 37°C e 5% de CO₂ com oleorresina ou extrato etanólico (32 ou 16 µg/mL para infecção posterior em BeWo, ou 16 ou 8 µg/mL para infecção posterior em HTR8/ SVneo). Paralelamente, os taquizoítos também foram tratados com SDZ + PYR (200 + 8 µg/mL para infecção posterior em BeWo, ou 100 + 4 µg/mL para infecção posterior em HTR8/SVneo), ou apenas meio. Posteriormente, os parasitos pré-tratados foram centrifugados, ressuspensos em meio sem tratamentos, e deixados interagir com células BeWo ou HTR8/SVneo previamente aderidas em placas de 96 poços. Por fim, duas análises diferentes foram realizadas: (1) para verificar a invasão de *T. gondii*, ambas as células foram mantidas com taquizoítos pré-tratados ou não por apenas 3 h; ou (2) para verificar a proliferação intracelular do parasito, as monocamadas celulares foram lavadas após 3 h de infecção, um meio de cultura suplementado fresco foi adicionado e a cultura mantida por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Em ambos os experimentos, o foi quantificado usando o ensaio de β-galactosidase, conforme descrito acima. Três experimentos independentes foram realizados em oito repetições.

4.10 Dosagem de citocinas por ELISA

Sobrenadantes de células BeWo, HTR8/SVneo e vilos placentários, sob diferentes condições experimentais, foram utilizados para quantificação de citocinas pelo ensaio imunossorvente ligado a enzima em sanduíche de anticorpo duplo (ELISA). ELISA para IL-6, IL-8, TNF, e IL-10 foram realizadas com o kit OpTEIA, BD Bioscience, San Diego, CA, EUA. Já para quantificação de MIF, foi utilizado o Kit DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA; seguindo as instruções do fabricante. Os limites de detecção de cada citocina foram 4,7 pg/mL para IL-6; 31,2 pg/mL para IL-8; 7,8 pg/mL para TNF, IL-10 e MIF.

Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IL-6, anti-IL-8, TNF, anti-IL-10 (BD Biosciences) overnight a 4 °C, e anti-MIF (R&D Systems) overnight a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS Tween 0,05% para posterior bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS a 10% de SFB (IL 6, IL-8, TNF, IL-, IL-10) e PBS

a 1% de albumina sérica bovina (BSA) para MIF. Após 1 h, as placas foram novamente lavadas, e as amostras e a curva padrão foram adicionadas e incubadas por mais 2 h a temperatura ambiente. As placas foram submetidas a consecutivas lavagens e em seguida os anticorpos de detecção anti-IL-6, anti-IL-8, TNF e anti-IL-10 conjugados com estreptavidina acoplada a peroxidase foram acrescentados ao sistema por adicionais 1 h; e anti-MIF por 2 h, todos em temperatura ambiente. Para MIF, as placas foram lavadas, e foi adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase por mais 20 min. Por fim, as placas foram lavadas e foi acrescentado 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) para a detecção dos imunocomplexos. Após a placa revelar, foi adicionado ácido sulfúrico H₂SO₄ [2N] para parar a reação. A leitura da placa foi realizada em uma leitora de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) a 450 nm. Os dados foram expressos em pg/mL de acordo com uma curva padrão de cada citocina para células BeWo e HTR8/SVneo. Enquanto para explantes vilosos, os dados foram normalizados de acordo com a concentração proteica de cada vilosidade. Para explantes vilosos, os dados de citocinas foram obtidos pela razão entre concentração de citocinas em pg/mL e concentração de proteína total do ensaio de Bradford em µg/mL, resultando em pg/mg de tecido. Os dados foram demonstrados em pg/mL de acordo com a curva padrão. Três experimentos independentes em triplicata foram realizados.

4.11 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células BeWo e HTR8/SVneo

A influência da oleorresina e do extrato etanólico na produção de ROS também foi verificada em células BeWo e HTR8/SVneo. O ensaio foi baseado na oxidação dependente de peróxido de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) para formar o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), com algumas modificações. Resumidamente, células BeWo (3×10⁴ células/poço/200 µL) ou HTR8/SVneo (1,5×10⁴ células/poço/200 µL) foram semeadas em placas de 96 poços. Em seguida, as células foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* (3:1) por 3 h, após as células foram lavadas abundantemente com meio de cultura e tratadas com oleorresina ou extrato etanólico (16 ou 32 µg/mL) para BeWo e (8 ou 16 µg/mL) para células HTR8/SVneo, ou ambas as células receberam células SDZ + PYR (200 + 8 µg/mL para BeWo e 100 + 4 µg/mL para HTR8/SVneo) ou apenas meio, como controles. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi usado como controle positivo para a produção de ROS. Após o tratamento por 24 h, as células foram colhidas, lavadas com PBS 1x e incubadas com 100 µL de H₂DCF-DA (10 µM; diluído em PBS 1x contendo 10% de SFB) por 45 min a 37°C

e 5% de CO₂ no escuro. Finalmente, a intensidade de fluorescência DCF foi detectada usando um espectrofotômetro de varredura multipoços GloMax Explorer (Promega, Madison, WI, EUA). Os dados são apresentados como intensidade de fluorescência mediana (MFI). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como controle positivo da produção de ROS e o controle negativo corresponde a células tratadas apenas com meio de cultura. Três experimentos independentes foram realizados em oito repetições.

4.12 Viabilidade de vilos coriônicos humanos tratados com extrato etanólico e oleorresina

Os vilos coriônicos humanos foram coletados conforme descrito no item 4.2 e cultivados em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram tratados com extrato etanólico e oleorresina (64, 128, 256 µg/mL) em meio com 10% de SFB durante 24 h, como controle, os vilos foram tratados apenas com meio com 10% de SFB (meio). Após o tempo de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e armazenados à - 80 °C para posterior dosagem de citocinas. Os vilos foram incubadas com 20 µL de MTT (5 mg/mL) acrescido de 180 µL de meio a 10% de SFB em estufa durante 4 h. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) e 50% de N,N-dimetilformamida (Sigma) *overnight*. Os vilos foram removidos de cada poço e a densidade óptica foi feita a 570 nm em leitor de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e os resultados foram expressos como % de vilos viáveis (% de viabilidade dos vilos) em relação aos vilos não tratados (100% de viabilidade) (TEIXEIRA et al., 2020; SOUZA et al., 2021). Foi realizado dois experimentos independentes em seis replicatas. Adicionalmente, para verificar a integridade do vilos tratados com extrato etanólico e oleorresina, estes foram coletados para análise morfológica usando coloração com hematoxilina e eosina (HE) (SILVA et al., 2017; FRANCO et al., 2019).

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

A proliferação intracelular de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos tratados ou não com o extrato etanólico e oleorresina foi verificada através do ensaio de β-galactosidase (SILVA et al., 2017). Os vilos coriônicos humanos foram cultivados em placas de 96 poços por

24 h em meio com 10% de SFB a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram infectados com *T. gondii* na proporção de 1×10^6 parasitos para cada poço em meio com 10% de SFB por 24 h. Em seguida, os vilos foram tratados com o extrato etanólico e oleorresina (64, 128, 256 µg/mL e SDZ+PYR 150 e 200 µg/mL, respectivamente) em meio com 10% de SFB por mais 24 h. Após 24 h de tratamento, o grupo de vilos foram coletados para posterior análise de proliferação pelo ensaio de β-galactosidase. Como controle, os vilos foram infectados e não tratados (meio infectado). Foram realizados dois experimentos independentes em seis replicatas. A proliferação intracelular de *T. gondii* em amostras de vilos coriônicos humanos foi realizada pela adição de 150 µL de tampão RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X100 1%, deoxicolato de sódio 1% (p/v) e 0,1% (p/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] suplementado com coquetel inibidor de protease (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) para cada vilo e homogeneizando as amostras em gelo para extração de proteínas. O homogenato foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para medir a proteína total (µg/mL) usando o ensaio de Bradford. Aliquotas de 20 µL de cada amostra foram usadas para determinar a proliferação intracelular de *T. gondii* pelo ensaio de βgalactosidase, como já descrito anteriormente. Os dados do número de parasitos foram normalizados de acordo com a concentração de proteína de cada vilo, mostrando o número de taquizoítos por µg de tecido. Os dados foram expressos como % de proliferação intracelular de *T. gondii*: o número médio de taquizoítos dos controles (vilos infectados e não tratados) correspondeu a 100% da proliferação do parasito, e o número de taquizoítos de cada condição de tratamento foi transformado em porcentagem de acordo com 100% de proliferação do parasito do grupo controle.

4.14 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) usando GraphPad Prisma versão 8.01. Diferenças significativas foram comparadas aos controles usando One-way ANOVA, o pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para os dados paramétricos. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Extrato etanólico de folha e oleorresina de *C. multijuga* alteraram a viabilidade celular apenas em concentrações mais altas

Primeiramente, avaliamos a viabilidade celular em células BeWo e HTR8/SVneo tratadas com extrato etanólico ou oleorresina em diversas concentrações. A redução de viabilidade celular foi detectada em células BeWo expostas a extrato etanólico ou oleorresina de 64 (*P <0,05) a 512 µg/mL (****P <0,00001) em comparação com células não tratadas (meio) (Fig. 1A-B). As células tratadas com DMSO não mostraram qualquer alteração na viabilidade celular em relação às células não tratadas (Fig. 1A-B). Por outro lado, células HTR8/SVneo diminuíram a viabilidade celular quando tratada com extrato etanólico ou oleorresina de 32 (***P < 0,0001, **P < 0,001) para 512 µg/mL (****P < 0,00001) quando comparado para células não tratadas (meio) (Fig. 1C-D). Conforme observado para BeWo, o DMSO também não induziu alteração na viabilidade celular para células HTR8/SVneo (Fig. 1C-D).

5.2 Extrato etanólico de folha e oleorresina reduziram significativamente a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR8/SVneo

Em nosso ensaio de viabilidade celular, estabelecemos concentrações de extrato etanólico e oleorresina que não alteraram a viabilidade das células BeWo e HTR8/SVneo para posterior realização dos experimentos. Tanto o extrato etanólico quanto a oleorresina reduziram significativamente a proliferação do parasito em células BeWo (Fig. 2A) e HTR8/SVneo (Fig. 2B) em todas as concentrações testadas em comparação com células não tratadas (meio) (***P < 0,0001; *** **P < 0,00001). Além disso, sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PYR) também diminuíram a replicação de *T. gondii* em relação às células não tratadas (****P < 0,00001). Esses resultados demonstraram que tanto o extrato etanólico quanto a oleorresina apresentaram efeito antiproliferativo contra *T. gondii*.

5.3 O extrato etanólico e a oleorresina exibiram efeito antiparasitário irreversível

Para determinar se os efeitos antiparasitários promovidos pelo extrato etanólico e oleorresina de *C. multijuga* seriam irreversíveis, expusemos células infectadas BeWo e HTR8/SVneo ao extrato etanólico ou oleorresina por 24 h, em seguida, as monocamadas

celulares foram lavadas e incubadas com meio livre de tratamento por mais 24 horas. Ao mesmo tempo, quantificamos a proliferação parasitária após 24 h de tratamento como linha de base para comparação. Para células BeWo, escolhemos 16 e 32 µg/mL para extrato etanólico e oleorresina; e para HTR8/SVneo, 8 e 16 µg/mL foram a escolha. Conforme detectado anteriormente (Fig. 2), novamente tanto o extrato etanólico quanto a oleorresina reduziram a proliferação intracelular de *T. gondii* após 24 h de tratamento em células BeWo (Fig. 3A) e HTR8/SVneo (Fig. 3B) quando comparados com células não tratadas (meio) (**P < 0,001, ****P < 0,00001). Além disso, SDZ + PYR diminuiu a replicação do parasito em relação às células não tratadas (****P < 0,00001) (Fig. 3A-B). Interessante, tanto o extrato etanólico quanto a oleorresina mostraram um efeito irreversível sobre os taquizoítos, uma vez que um crescimento reduzido do parasito permaneceu ativo nas células BeWo e HTR8/SVneo em comparação com as células não tratadas (considerada como 100% de reversibilidade), mesmo após a remoção dos tratamentos por mais 24 h (****P < 0,00001) (Fig. 3A-B). Para ambas as células, SDZ + PYR também apresentou efeito irreversível (****P < 0,00001) (Fig. 3A-B). Esses resultados sugerem que tanto o extrato etanólico quanto a oleorresina mantiveram seu efeito antiproliferativo mesmo após a remoção do tratamento.

A fim de obter mais informações sobre o efeito desencadeado tanto pelo extrato etanólico quanto pela oleorresina sobre os taquizoítos de *T. gondii*, avaliamos se parasitos intracelulares obtidos diretamente de células BeWo e HTR8/SVneo tratadas poderiam manter sua capacidade de infectar novas células hospedeiras. Para isso, taquizoítos foram coletados de células BeWo e HTR8/Svneo tratadas com extrato etanólico ou oleorresina e usados para infectar novas células de monocamadas. Para as células BeWo, todas as concentrações de extrato etanólico e oleorresina reduziram a capacidade dos taquizoítos de infectar novas células BeWo quando comparadas às células não tratadas (meio) (**P < 0,0001; ****P < 0,00001) (Fig. 3C). SDZ + PYR também reduziu a capacidade dos parasitos de infectar novas células BeWo em relação ao meio (****P < 0,00001) (Fig. 3C). Embora o extrato etanólico e a oleorresina tenham diminuído a capacidade dos parasitos de infectar novas células BeWo, esse efeito foi menor se comparado ao tratamento clássico (SDZ + PYR) (&P < 0,05) (Fig. 3C). Finalmente, para células HR8/SVneo, todos os tratamentos (extrato etanólico, oleorresina e SDZ + PYR) diminuíram a capacidade de *T. gondii* de infectar novas células HTR8/SVneo em comparação com células não tratadas (*P < 0,05; **P < 0,001; ****P < 0,00001) (Fig. 3D). Interessantemente, os parasitos derivados de células tratadas com extrato etanólico a 16 µg/mL demonstraram menor capacidade de infectar novas células quando comparados a SDZ + PYR (&P < 0,05) (Fig. 3D).

5.4 O pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com extrato etanólico e oleorresina alterou adesão, invasão e subseqüente proliferação intracelular

Para avaliar se o extrato etanólico e a oleorresina têm ação direta sobre os taquizoítos, realizamos uma variedade de ensaios. No primeiro conjunto de experimentos, avaliamos se os tratamentos com extrato etanólico e oleorresina afetariam a adesão do parasito às células hospedeiras. Para tanto, taquizoítos de *T. gondii* foram pré-tratados por 1 h com oleorresina ou extrato etanólico e então incubados com células BeWo ou HTR8/SVneo previamente fixadas. Como resultado para as células BeWo, apenas o extrato etanólico ou oleorresina a 32 µg/mL foi capaz de reduzir o número de células com parasitos aderidos quando comparados aos parasitos não tratados (médio) (**P < 0,0001, *P < 0,05) (Fig. 4A). Por outro lado, todas as concentrações dos tratamentos, exceto SDZ + PYR, reduziram o número total de parasitos aderidos em relação aos parasitos não tratados (****P < 0,00001, **P < 0,001) e parasitos tratados com SDZ + PYR (&P < 0,05) (Fig. 4B). Imagens representativas mostrando o efeito do extrato etanólico e oleorresina em células BeWo incubadas com taquizoítos pré-tratados podem ser observadas nas Fig. 4C-F.

Da mesma forma, parasitos pré-tratados com extrato etanólico ou oleorresina diminuíram sua capacidade de adesão em células HTR8/SVneo, uma vez que o número de taquizoítos aderidos bem como o número total de parasitos aderidos por campo foram significativamente menores quando relacionados aos parasitos não tratados (médio) (****P < 0,00001) e parasitos tratados com SDZ + PYR (&P < 0,05) (Fig. 5A-B). Além disso, SDZ + PYR reduziu o número de células com parasitos aderidos (**P < 0,0001) e o número total de parasitos aderidos (**P < 0,001) em relação ao meio (Fig. 5A-B). Imagens representativas mostrando o efeito do extrato etanólico e da oleorresina em células HTR8/SVneo incubadas com taquizoítos pré-tratados podem ser observadas na Fig. 5C-F.

Considerando que os parasitos pré-tratados apresentaram menor capacidade de adesão às células hospedeiras (Fig. 4 e 5), agora verificamos a capacidade de invadir e proliferar quando também pré-incubados com extrato etanólico ou oleorresina. Nossos dados demonstraram que o pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com todas as concentrações de extrato etanólico ou oleorresina desencadeou baixas taxas de invasão e subseqüente proliferação intracelular, independentemente do tipo de célula (**P < 0,0001, ****P < 0,00001), em comparação com parasitos não tratados (meio) (Fig. 6A-D). SDZ + PYR também reduziu a invasão e replicação de taquizoítos pré-tratados em células BeWo e HTR8/SVneo em relação ao meio (**P < 0,001, ***P < 0,0001, ****P < 0,00001) (Fig. 6A- D).

5.5 Extrato etanólico de folhas e oleorresina de *C. multijuga* regularam positivamente IL-6, e modularam negativamente os níveis de IL-8 em células BeWo

Até agora, nossos achados sugerem que o extrato etanólico e a oleorresina de *C. multijuga* têm efeito direto sobre os parasitos, uma vez que os parasitos tratados têm capacidade reduzida de aderir, invadir e replicar nas células. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que esses compostos possam afetar o ambiente da célula hospedeira. Assim, investigamos os possíveis efeitos imunomoduladores do extrato etanólico e da oleorresina, através da quantificação de citocinas no sobrenadante da cultura celular.

Para células BeWo, nossos resultados mostraram que, na ausência de infecção, concentrações de 32 µg/mL de extrato etanólico e oleorresina induziram um aumento nos níveis de IL-6 em comparação com células não tratadas (meio) (*P < 0,05, **P < 0,001) e SDZ + PYR (&P < 0,05) (Fig. 7A). Após a infecção por *T. gondii*, os níveis de IL-6 foram maiores nas células não tratadas/infectadas (Tg média) em comparação com as células não tratadas e não infectadas (média) (#P < 0,05). No entanto, SDZ + PYR reduziu a IL-6 em relação às células não tratadas/infectadas (**P < 0,001). Além disso, todas as concentrações de extrato etanólico ou oleorresina induziram uma regulação positiva de IL-6 em células BeWo infectadas quando comparadas com células tratadas com SDZ + PYR (&P < 0,05). Além disso, 32 µg/mL de oleoresina induziu aumento de IL-6 em comparação com células não tratadas/infectadas (**P < 0,001) (Fig. 7B).

Em relação à IL-8, as células BeWo não infectadas reduziram ou aumentaram o nível dessa citocina quando tratadas com SDZ + PYR ou 32 µg/mL, respectivamente (***P < 0,0001) em relação às células não tratadas (média) (Fig. 7C). Curiosamente, 32 µg/mL de oleoresina desencadeou maior liberação de IL-8 em comparação com células tratadas com SDZ + PYR (&P < 0,05) (Fig. 7C). No entanto, todas as concentrações de extrato etanólico e oleorresina reduziram a IL-8 em células BeWo infectadas em comparação com células não tratadas/infectadas (meio Tg) (****P < 0,00001) ou células tratadas com SDZ + PYR (&P < 0,05) (Fig. 7D).

Para a produção de MIF, as células BeWo não infectadas aumentaram a liberação desta citocina em todas as concentrações de extrato etanólico e oleorresina quando comparadas às células não tratadas (meio) (*P < 0,01, **P < 0,001, ****P < 0,00001) ou células tratadas com SDZ + PYR (&P < 0,05) (Fig. 7E). No entanto, na presença de infecção, as células não tratadas e tratadas com oleorresina 32 µg/mL regularam positivamente ou modularam negativamente o

MIF em comparação ao meio ($\#P < 0,05$) ou meio *Tg* ($*** P < 0,0001$), respectivamente (Fig. 7F).

Finalmente, medimos ROS em células BeWo infectadas ou não com *T. gondii* e tratadas ou não com extrato etanólico ou oleorresina. Observamos que as células não infectadas tratadas com 32 $\mu\text{g/mL}$ de extrato etanólico aumentaram o nível de ROS em relação às células não tratadas (meio) ($*P < 0,01$) e células tratadas com SDZ + PYR ($\&P < 0,05$) (Fig. 7G). Além disso, as células BeWo infectadas não alteraram a liberação de ROS na presença de qualquer tratamento (Fig. 7H).

TNF e IL-10 não foram detectados nos sobrenadantes de células HTR8/Svneo sob quaisquer condições experimentais (dados não mostrados).

5.6 Extrato etanólico e oleorresina de *C. multijuga* modularam a produção de citocinas e ROS em células HTR8/SVneo

Também verificamos a produção de citocinas e ROS em células HTR8/SVneo infectadas ou não com *T. gondii* e tratadas ou não com extrato etanólico ou oleorresina. Na ausência de infecção, as células HTR8/SVneo aumentaram a liberação de IL-6 quando tratadas com extrato etanólico (8 $\mu\text{g/mL}$) ou oleorresina (16 $\mu\text{g/mL}$) em comparação com células não tratadas (meio) ($*P < 0,01$, $** P < 0,001$) e células tratadas com SDZ + PYR ($\&P < 0,05$) (Fig. 8A). Na presença de infecção, células HTR8/SVneo não tratadas, assim como células tratadas com extrato etanólico ou oleorresina, aumentaram os níveis de IL-6 em relação ao meio ou células tratadas com SDZ + PYR, respectivamente ($\#P < 0,05$, $\&P < 0,05$) (Fig. 8B). Além disso, IL-6 foi menor em células tratadas com SDZ + PYR em comparação com células não tratadas e infectadas (meio *Tg*) ($**P < 0,001$) (Fig. 8B).

Em relação à IL-8 para células não infectadas, SDZ + PYR reduziu IL-8 ($***P < 0,0001$) e todas as concentrações de extrato etanólico e oleorresina ($*P < 0,01$, $****P < 0,00001$) aumentaram IL-8 quando comparado ao meio (Fig. 8C). Além disso, extrato etanólico e oleorresina apresentaram níveis mais elevados de IL-8 em comparação com SDZ + PYR ($\&P < 0,05$) (Fig. 8C). Quando células HTR8/SVneo foram infectadas por *T. gondii*, IL-8 foi aumentada em relação ao meio ($\#P < 0,05$), SDZ + PYR diminuiu IL-8 em comparação apenas com células infectadas (meio *Tg*) ($**** P < 0,00001$), e todos os tratamentos com extrato etanólico ou oleorresina aumentaram a IL-8 em relação a SDZ + PYR ($\&P < 0,05$) (Fig. 8D).

A produção de MIF não foi significativamente alterada em células HTR8/SVneo não infectadas, exceto para células não infectadas e tratadas com SDZ + PYR ($*P < 0,01$) (Fig. 8E).

Embora não estatisticamente diferente, apenas infecção, extrato etanólico e oleorresina apresentaram aumento na liberação de MIF (Fig. 8F).

Finalmente, medimos ROS em células HTR8/SVneo infectadas ou não com *T. gondii* e tratadas ou não com extrato etanólico ou oleorresina. Observamos que células não infectadas tratadas com extrato etanólico, oleorresina ou SDZ + PYR apresentaram baixos níveis de ROS em relação às células não tratadas (médio) (*P < 0,01, **P < 0,001, ***P < 0,0001, **** P < 0,00001) (Fig. 8G). Embora não estatisticamente diferente, apenas infecção, extrato etanólico e oleorresina apresentaram redução na liberação de ROS (Fig. 8H).

TNF e IL-10 não foram detectados nos sobrenadantes de células HTR8/Svneo sob quaisquer condições experimentais (dados não mostrados).

5.7 Vilos coriônicos humanos tratados com o extrato etanólico e a oleorresina não alteram a viabilidade

Avaliamos a ação do extrato etanólico e da oleorresina contra a infecção parasitária em no vilos coriônicos humanos. Primeiro, para determinar uma concentração não tóxica para usar em experimentos posteriores, a viabilidade do explante de vilosidades após os tratamentos com o extrato etanólico e da oleorresina foi realizada medindo a liberação de LDH e o ensaio de MTT. Nossos dados mostraram que os tratamentos com o extrato etanólico e oleorresina não alteraram a viabilidade tecidual em nenhuma das concentrações testadas, nem alteraram os níveis de LDH. O tratamento com SDZ+PYR não causou citotoxicidade significativa nos vilos coriônicos em comparação com os vilos coriônicos não tratados (grupo controle) (Fig. 9A e B). Com base nesses resultados, utilizamos a concentração de 256 µg/mL como a maior concentração que não alterou a integridade do tecido o extrato etanólico e da oleorresina, para a análise da morfologia dos vilos coriônicos para corroborar com os demais ensaios de viabilidade. Nossos resultados demonstraram que os tratamentos com o extrato etanólico e da oleorresina não alteraram a morfologia do tecido Fig. (9E e F) mantiveram a estrutura do tecido, apresentando sinciciotrofoblasto, e mesênquima com morfologia normal quando comparado com o controle (vilos não tratados).

5.8 Extrato etanólico de folhas e oleorresina de *C. multijuga* controlam a proliferação intracelular de *T. gondii* e não alteram o perfil de citocinas em vilos coriônicos humanos

Avaliamos os efeitos do extrato etanólico e oleorresina (256 e 128 µg/mL) no controle da proliferação intracelular de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos utilizando o ensaio de β-galactosidase. Observamos que os tratamentos em ambas as concentrações de extrato etanólico e oleorresina reduziram significativamente a porcentagem de parasitos intracelulares, sendo: extrato etanólico 128 e 256 µg/mL (**P<0,0001) e oleorresina 128µg/mL (**P<0,001), 256 µg/mL (**P<0,0001), em comparação com vilos coriônicos não tratados (grupo controle - considerado como 100% de proliferação dos parasitos). Como esperado, o tratamento com SDZ+PYR (150 e 200 µg/mL, respectivamente) também inibiu o crescimento do parasito (**P<0,0001) em comparação com o grupo não tratado (meio) Fig (10).

Em adição, nós avaliamos se o extrato etanólico e oleorresina modularia o perfil de citocinas nos vilos coriônicos. Nossos resultados mostraram que todas as citocinas IL-6, IL-8, IL-10, MIF, TNF não apresentaram alteração em sua produção em relação aos grupos controles.

6 DISCUSSÃO

A toxoplasmose é considerada um problema de saúde global com quase um bilhão de pessoas infectadas, atingindo uma prevalência da doença em 71,5% (AHMADPOUR et al., 2019). Em relação ao tratamento, a combinação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PYR) é a primeira escolha para tratar a toxoplasmose congênita, uma das formas mais graves da doença (ABUGRI et al., 2019). Apesar da grande importância clínica, o tratamento convencional da toxoplasmose congênita é atualmente limitado, e também está associado a sérios efeitos colaterais tanto na mãe quanto na criança (MONTROYA et al., 2008; HALONEN et al., 2013). Nesse sentido, a busca por ferramentas terapêuticas alternativas tem ganhado atenção.

Para avaliar o impacto do extrato etanólico das folhas e da oleorresina de *C. multijuga* na infecção por *T. gondii*, utilizamos células BeWo e HTR8/SVneo como modelos de células trofoblásticas vilosas e extravilosas, respectivamente, sendo considerados excelentes modelos experimentais para o estudo de toxoplasmose congênita *in vitro* (BARBOSA et al., 2014; CASTRO-FILICE et al., 2014; FRANCO et al., 2019; DE SOUZA et al., 2021). Primeiramente, foi realizado um ensaio de viabilidade, quando células BeWo e HTR8/SVneo

foram submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico das folhas e oleorresina por 24 h. Nossos resultados mostraram que ambos os compostos reduziram a viabilidade das células BeWo e HTR8/SVneo apenas em concentrações mais altas. Em seguida, células BeWo e HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii* foram tratadas com concentrações não tóxicas do extrato etanólico ou oleorresina por 24 h e a replicação do parasito foi verificada. Nossos achados revelaram que ambos os compostos inibiram eficientemente a proliferação intracelular de *T. gondii*. Além disso, demonstramos que os taquizoítos obtidos de células infectadas e tratadas apresentaram baixa capacidade de invasão e replicação, sugerindo que o extrato etanólico e a oleorresina de *C. multijuga* desencadearam um efeito irreversível sobre os taquizoítos.

Em concordância com nossos dados, estudos já demonstraram que as oleorresinas de *Copaifera* apresentam atividade contra alguns patógenos. *C. pubiflora* e seu composto (ácido *ent-hardwickiic*) mostraram propriedades antibacterianas, as quais podem ser exploradas como novas alternativas terapêuticas para tratar doenças bucais como cárie dentária e infecções endodônticas (MORAES et al., 2020). (PIERI et al., 2012) demonstrou que o ácido copálico e o β -cariofileno são componentes comuns obtidos a partir de oleorresinas e sugeriu que a bioatividade da oleorresina de *Copaifera* na replicação de *Trypanosoma cruzi* se deve a esse sinergismo. Além disso, terpenos isolados de oleorresinas de *Copaifera* promoveram alterações no metabolismo oxidativo, induziram autofagia e diminuíram a proliferação de formas replicativas de *T. cruzi*, em particular as amastigotas (IZUMI et al., 2012). IZUMI et al. (2013) testaram oleorresinas de oito espécies de *Copaifera* contra *T. cruzi*, e oleoresinas de *C. martii* e *C. officinalis* exibiram a melhor atividade contra formas replicativas do parasita. Um estudo mais recente demonstrou que a oleorresina e o ácido caurenóico de *C. martii* diminuíram a proliferação de amastigotas de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais murinos e em células HeLa (KIAN et al., 2018). Além disso, macrófagos peritoneais murinos tratados com óleo de *C. reticulata* controlaram significativamente a infecção por *Leishmania amazonensis* (SANTOS et al., 2018), enquanto o óleo de *C. martii* promoveu uma redução no tamanho da lesão da pata causada por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c (SANTOS et al., 2011). Também, o tratamento com nanoemulsão de *Copaifera* levou a uma redução nos níveis de infecção por *L. infantum* e *L. amazonensis* em culturas de macrófagos, bem como apresentou efeitos benéficos no tamanho da lesão e carga parasitária em camundongos BALB/c (DHORM et al., 2018). Além disso, fibroblastos humanos tratados com oleoresina de *C. reticulata* mostraram atividade contra as cepas de *Plasmodium falciparum* W2 e 3D7 e reduziram a parasitemia em camundongos BALB/c (DE SOUZA et al., 2017). Finalmente, em estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, demonstramos que as oleorresinas de *C. reticulata*, *C. duckei*, *C. paupera* e

C. publifora promoveram uma redução significativa na infecção por *T. gondii* em células BeWo (TEIXEIRA et al., 2020).

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de células nucleadas (DUBEY et al., 2008). Portanto, o estabelecimento bem-sucedido da infecção requer a capacidade do parasito de aderir, invadir e proliferar dentro da célula hospedeira (HALL et al., 2011; ADEYEMI et al., 2017). Portanto, a próxima questão que propusemos determinar foi a ação direta do extrato etanólico e da oleorresina de *C. multijuga* sobre os taquizoítos. Para isso, pré-tratamos os parasitos por 1 h e incubamos com células BeWo ou HTR8/SVneo para avaliar adesão, invasão e replicação. O parasito pré-tratado demonstrou menor capacidade de aderir, invadir e proliferar em células BeWo e HTR8/SVneo. Esses achados estão de acordo com nosso estudo anterior, em que taquizoítos pré-incubados com oleorresinas de *C. reticulata*, *C. duckei*, *C. paupera* e *C. publifora* apresentaram menores taxas de adesão, invasão e subsequente proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo (TEIXEIRA et al., 2020). Similarmente, outros estudos já demonstraram que parasitos pré-tratados com outras drogas também apresentaram capacidade reduzida de infecção. (CASTRO-FILICE et al., 2014). Mostraram que o pré-tratamento de *T. gondii* com uma combinação de SDZ + PYR + ácido folínico ou azitromicina reduziu a proliferação parasitária após 72 h em explantes de vilosidades humanas. Da mesma forma, taquizoítos de cepas atípicas de *T. gondii* pré-tratados com azitromicina ou espiamicina apresentaram menor capacidade de invadir e replicar em células BeWo (RIBEIRO et al., 2017). Assim, a abordagem experimental de pré-tratamento com oleorresina e extrato etanólico de *C. multijuga* sugerem que esses compostos podem afetar diretamente a estrutura do parasito e, conseqüentemente, diminuir sua capacidade funcional. Um estudo recente reportou que esses compostos naturais podem afetar diferentes estruturas em *T. cruzi* e *Leishmania* spp., e há a hipótese de que a mitocôndria seja um alvo estratégico para induzir a morte do parasito (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2022). Além disso, as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* tratadas com nanoemulsão de *Copaifera* apresentaram alterações ultraestruturais como formato celular oval e flagelos retraídos (DHORM et al., 2018). Nosso estudo anterior demonstrou que *C. paupera*, *C. reticulata*, *C. publifora* e *C. duckei* causaram alterações ultraestruturais em taquizoítos intracelulares de *T. gondii*, evidenciado por parasitos unidos por suas membranas, sugerindo um bloqueio da endodiogenia parasitária (TEIXEIRA et al., 2020). Estudos futuros são necessários para investigar os tipos de alterações estruturais que ocorrem em *T. gondii* quando tratados com esses o extrato etanólico e oleorresina de *C. multijuga*.

Em um segundo momento, após demonstrar o efeito de *C. multijuga* na replicação de taquizoítos, assim como na adesão e invasão, investigamos a resposta imune das células hospedeiras, hipotetizando que esses compostos poderiam estar envolvidos na modulação do ambiente celular do hospedeiro. Observamos que as células BeWo regularam positivamente a produção de IL-6 e modularam negativamente os níveis de IL-8. É amplamente conhecido que a IL-6 é um importante citocina envolvida no controle do *T. gondii* em vários tipos celulares, como macrófagos e monócitos (PEREIRA et al., 2019) e trofoblastos humanos e murinos (BARBOSA et al., 2014; BARBOSA et al., 2015; SILVA et al., 2017; GOMES et al., 2018). Assim, é plausível sugerir que o aumento de IL-6 em células BeWo infectadas e tratadas com extrato etanólico ou oleorresina foi importante para controlar a replicação de *T. gondii*. Embora o MIF seja uma citocina importante durante a infecção por *T. gondii* (SILVA et al., 2017), o nível desta citocina aumentou apenas em células não infectadas tratadas com BeWo ou células tratadas com oleoresina a 32 µg/mL, sugerindo que o MIF não tenha um papel efetivo para o controle do parasito quando oleorresina ou extrato etanólico são usados em células BeWo. A IL-8 é um membro da família de quimiocinas CXC e é um importante mediador durante a resposta imune inata contra vários patógenos (DONG et al., 2015). Estudos mostraram que *T. gondii* tem capacidade de atrair IL-8 e esta citocina pode recrutar células inflamatórias para a infecção local, atraindo neutrófilos e células dendríticas imaturas e, conseqüentemente, promovendo uma disseminação da infecção pelo organismo hospedeiro (SOMMERVILLE et al., 2013). Nosso estudo anterior mostrou baixos níveis de IL-8 em células THP-1 infectadas por *T. gondii* e inibidas pela ciclooxigenase 2 (COX-2), que contribuem para o controle da replicação do parasito (PEREIRA et al., 2019). Nesse sentido, é possível levantar a hipótese de que os baixos níveis de IL-8 em células BeWo tratadas com extrato etanólico e oleorresina de *C. multijuga* possam ter contribuído para o controle de *T. gondii*. Estudos futuros são necessários para verificar a influência da *Copaifera* na modulação da COX-2. Portanto, em células BeWo, o controle de *T. gondii* mediado por extrato etanólico e oleorresina de *C. multijuga* foi uma associação entre a ação direta desses compostos sobre os taquizoítos, bem como a resposta imune dessas células. Para células HTR8/SVneo, extrato etanólico e oleorresina modularam significativamente IL-6 e IL-8 quando *T. gondii* não estava presente. No entanto, na presença de infecção, essas citocinas foram levemente moduladas (não estatisticamente significativas) quando comparadas com células não tratadas/infectadas. Assim, é possível concluir que as citocinas analisadas não contribuíram para o controle de *T. gondii* em células HTR8/SVneo quando tratadas com compostos de *C. multijuga*. Assim, levando em consideração as análises feitas no presente estudo, a ação direta desses compostos sobre os

taquizoítos foi o único mecanismo de modulação negativa da infecção neste tipo celular. Finalmente, a produção de ROS não foi significativa em células BeWo e HTR8/SVneo infectadas e tratadas.

Após a avaliação feita em modelos *in vitro* dos efeitos de nossos compostos sobre o *T. gondii*, sua ação foi avaliada em um modelo *ex vivo* de explantes de vilosidades humanas de terceiro trimestre de gestação, destacando que a viabilidade foi mantida em todos os tratamentos avaliados anteriormente por MTT, ensaio de LDH e análise morfológica. Estudos anteriores mostraram que a análise morfológica de vilosidades por microscopia de luz acaba sendo uma das técnicas mais eficientes para determinar a viabilidade de tecidos *in vitro*, uma vez que células como o sinciciotrofoblasto são extremamente sensíveis às condições do meio, se houver alteração na viabilidade, degeneram rapidamente, sendo possível observar descolamento de fibrinóides e necrose (MILLER et al., 2005). Nosso grupo de pesquisa demonstrou em estudos anteriores que as vilosidades eram resistentes ao tratamento com azitromicina e à combinação de sulfadiazina e pirimetamina (CASTRO-FILICE et al., 2014), bem como a enrofloxacin e toltrazuril (SILVA et al., 2017), e diferentes espécies de *Copaiifera* (TEIXEIRA et al., 2020).

Posteriormente investigamos a proliferação do parasito em explantes de vilosidades placentárias, quando observamos que os resultados foram semelhantes em relação às células BeWo e HTR8/SVneo, comprovando que o efeito do extrato etanólico e oleorresina de *C. multijuga* foi eficiente em reduzir significativamente a proliferação de *T. gondii* nas amostras de vilosidades placentárias. Também demonstramos em várias investigações o efeito de drogas anti-*T. gondii* alternativas em vilos humanos. (CASTRO-FILICE et al., 2014) demonstraram a resistência dos vilos aos tratamentos com azitromicina em associação com SDZ e PYR. (SILVA et al., 2017) observaram a tolerância de explantes de vilosidades humanas no terceiro trimestre a tratamentos com enrofloxacin e toltrazuril. Recentemente, (TEIXEIRA et al., 2020) demonstrou o efeito antiparasitário em vilosidades placentárias, utilizando diferentes espécies de *Copaiifera*. Com esses achados podemos afirmar que os compostos avaliados possuem ação protetora sobre células trofoblásticas humanas e explantes de vilosidades infectados por *T. gondii*, demonstrando o potencial efeito do extrato etanólico e da oleorresina no controle da infecção por *T. gondii* em células da interface materno-fetal humana. Após avaliar a viabilidade de vilosidades e proliferação parasitária, investigamos se a ação do extrato etanólico e da oleorresina poderia estar envolvida na modulação do ambiente da célula hospedeira. Observamos que tanto as vilosidades infectadas e não infectadas, e tratadas com extrato etanólico ou oleorresina, não apresentaram alteração significativa de IL-6, IL-8, IL-10, MIF, TNF α (dados não apresentados).

Concluindo com base nos resultados do estudo, o extrato etanólico e a oleorresina obtidas do tronco de *C. multijuga* apresentaram diferentes atividades antiparasitárias de forma dependente da população trofoblástica. Para BeWo, representante do trofoblasto viloso humano, *C. multijuga* apresentou ação direta no taquizoíto e modulação da resposta imune; enquanto apenas efeito direto em taquizoítos participou do controle parasitário em células HTR8/SVneo, representativas do trofoblasto extraviloso humano. Nas vilosidades humanas como o melhor modelo da interface materno-fetal, nós afirmamos que também teve ação direta sobre os taquizoítos participando no controle da infecção. Considerando todos esses parâmetros, o extrato etanólico e a oleorresina de *C. multijuga* podem ser alvos para o estabelecimento de uma nova estratégia terapêutica para a toxoplasmose congênita. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para avaliar os componentes bioativos e outros possíveis mecanismos desses compostos.

7 FIGURAS

Figura 1. Viabilidade de células BeWo e HTR8/SVneo após tratamento com extrato etanólico ou oleorresina.

Células BeWo (A-B) e HTR8/SVneo (C-D) foram tratadas ou não com várias concentrações de oleorresina ou extrato etanólico de *C. multijuga* por 24 h, e o ensaio de MTT foi realizado. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem (% de viabilidade celular), considerando a absorbância das células incubadas apenas com meio como 100% de viabilidade. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados com oito repetições. Diferenças significativas detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. *P < 0,05 e ***P < 0,0001 em relação ao meio.

Figura 1

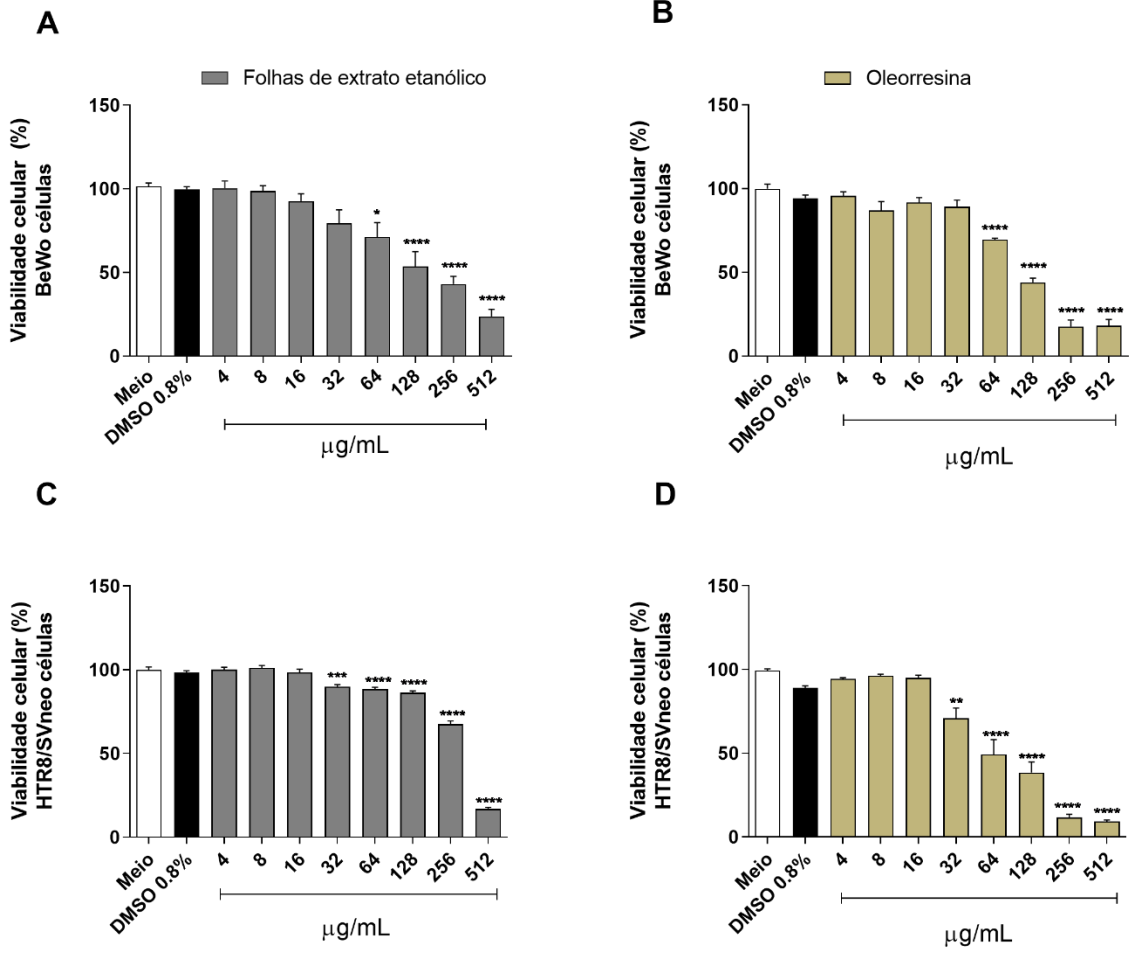


Figura 2. Proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo e HTR8/SVneo tratadas com extrato etanólico ou oleorresina.

Células BeWo (A) e HTR8/SVneo (B) foram infectadas por *T. gondii* por 3 h, lavadas para remoção de parasitas extracelulares e tratadas ou não com concentrações não tóxicas de extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga* por 24 h. Células não tratadas e infectadas (médias) foram consideradas como 100% de proliferação parasitária, e uma combinação de sulfadiazina e piremetamina (SDZ+PYR) foi usada como controle positivo. A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase e expressa como porcentagem (% de proliferação de *T. gondii*) em comparação com células não tratadas (média). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos realizados em oito repetições. Diferenças significativas detectadas pelo One-way ANOVA, de Bonferroni, pós-teste de comparações múltiplas. ***P < 0,0001 ou ****P < 0,00001 em relação ao meio.

Figura 2

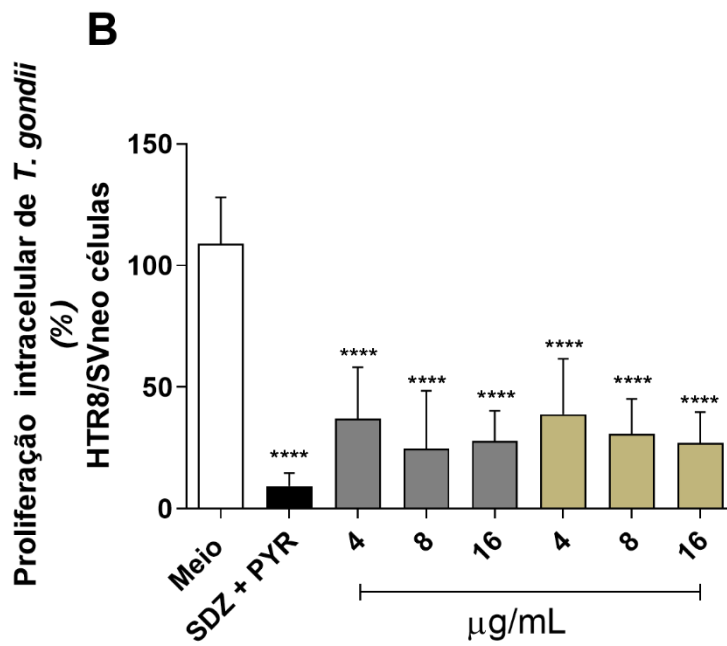
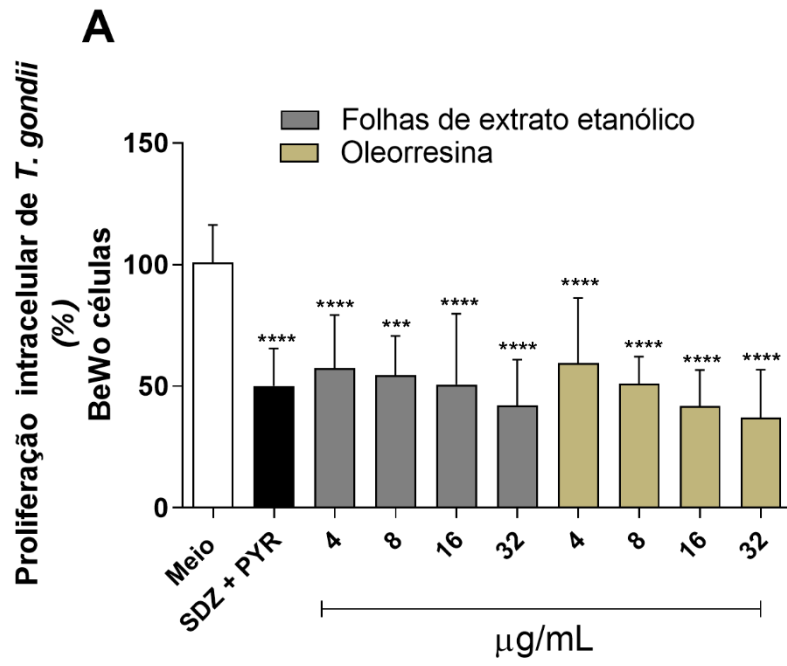


Figura 3. Efeitos antiparasitários do extrato etanólico e oleorresina avaliados no teste de reversibilidade.

Células BeWo (A) e HTR8/SVneo (B) foram infectadas por *T. gondii* por 3 h, lavadas para remoção de parasitas extracelulares e tratadas ou não com concentrações não tóxicas de extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga* por 24 h. Células não tratadas e infectadas (médias) foram consideradas como 100% de reversibilidade do tratamento, e uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ+PYR) foi utilizada como controle positivo. Paralelamente, ambas as células foram infectadas por 3h, lavadas, tratadas ou não com extrato etanólico ou oleorresina por 24h, lavadas para remoção dos tratamentos e mantidas por mais 24h em meio livre de tratamento. A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase e expressa em porcentagem (reversibilidade do tratamento) em comparação com células não tratadas (meio). O índice de reversibilidade mediu a capacidade dos parasitas de se recuperar do tratamento e proliferar em novas células. Finalmente, parasitas obtidos diretamente de células BeWo (C) e HTR8/SVneo (D) tratadas com extrato etanólico ou oleorresina foram coletados e usados para infectar novas células por 3 h. O número de taquizoítos foi determinado usando o ensaio de β -galactosidase e expresso como % de invasão de *T. gondii*. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos realizados em oito repetições. Diferenças significativas detectadas pelo One-way ANOVA, de Bonferroni, pós-teste de comparações múltiplas. *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,0001 ou ****P < 0,00001 em relação ao meio. &P < 0,05 em relação a SDZ + PYR.

Figura 3

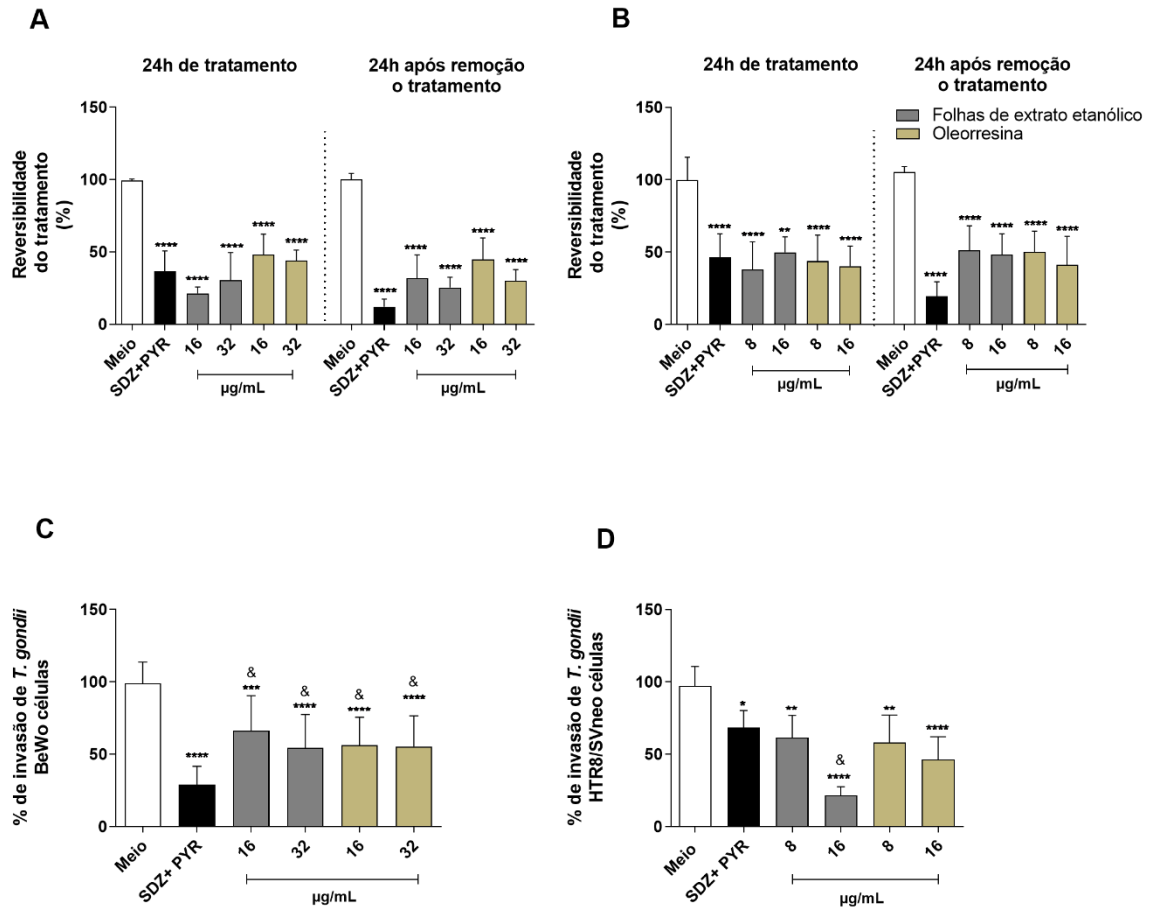


Figura 4. Ensaio de adesão de taquizoítos de *T. gondii* em células BeWo.

Os taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 h com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga*, e então deixados interagir com células BeWo previamente fixadas durante 3 h. Como controle, os taquizoítos foram incubados com SDZ + PYR ou apenas meio (meio). O número de células com parasitas aderidos (A) e o número total de parasitas aderidos (B) foram determinados em um total de 20 campos examinados aleatoriamente com lente objetiva de 20X. Imagens representativas destacando o efeito dos tratamentos na interação taquizoíto-célula hospedeira: (C) parasitos não tratados, (D) 32 µg/mL de extrato etanólico, (E) 16 µg/mL de oleorresina e (F) 32 µg/mL de oleoresina. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos realizados em três repetições. Diferenças significativas detectadas pelo One-way ANOVA e pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *P < 0,05, ***P < 0,0001 ou ****P < 0,00001 em relação ao meio. &P < 0,05 em relação a SDZ + PYR. As setas brancas indicam taquizoítos ligados às células BeWo. O núcleo da célula é marcado com TOPRO-3 (azul). Taquizoítos de *T. gondii* marcados com IgG anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (verde). A actina F marcada com faloidina-TRITC é mostrada em vermelho. Barra de escala: 50 µm.

Figura 4

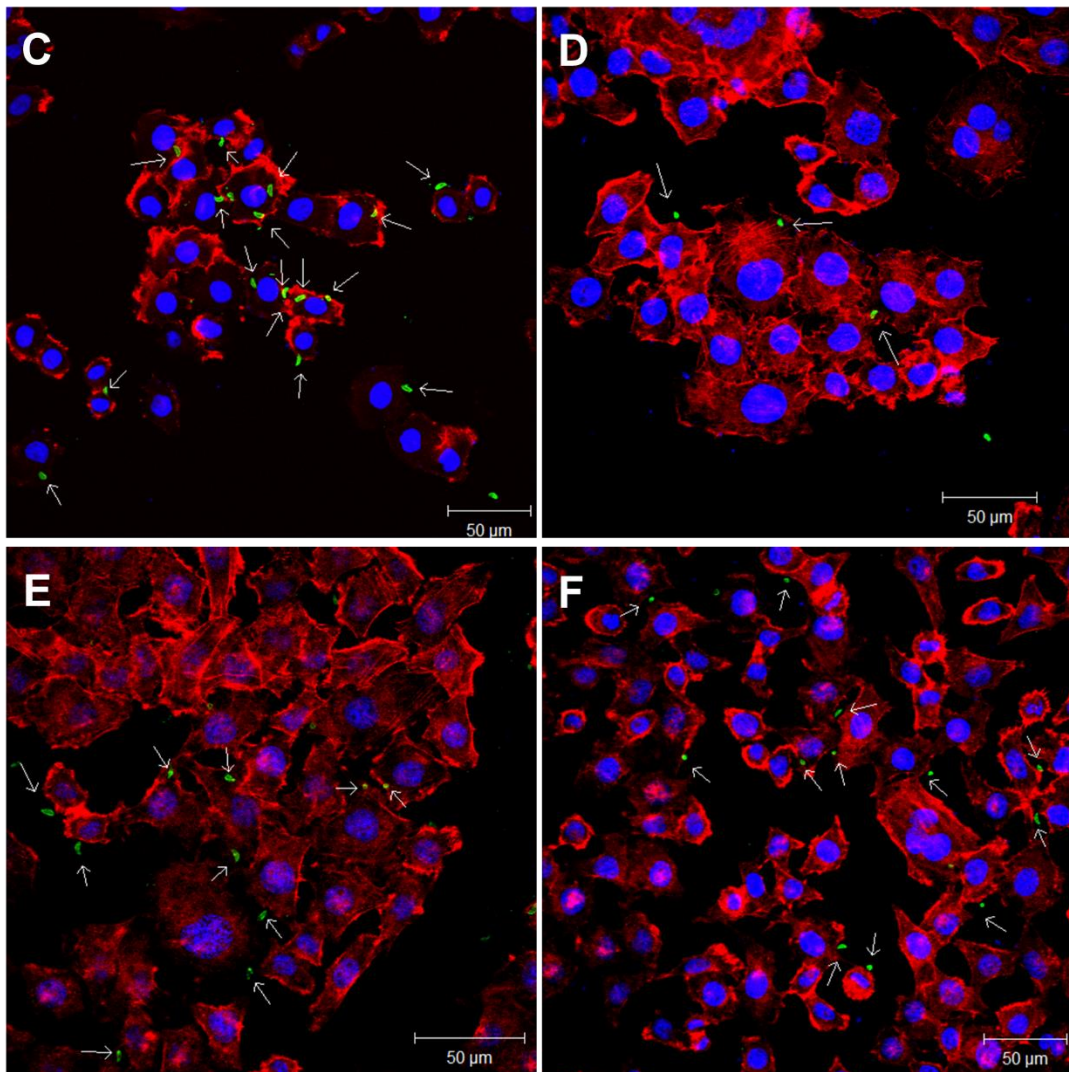
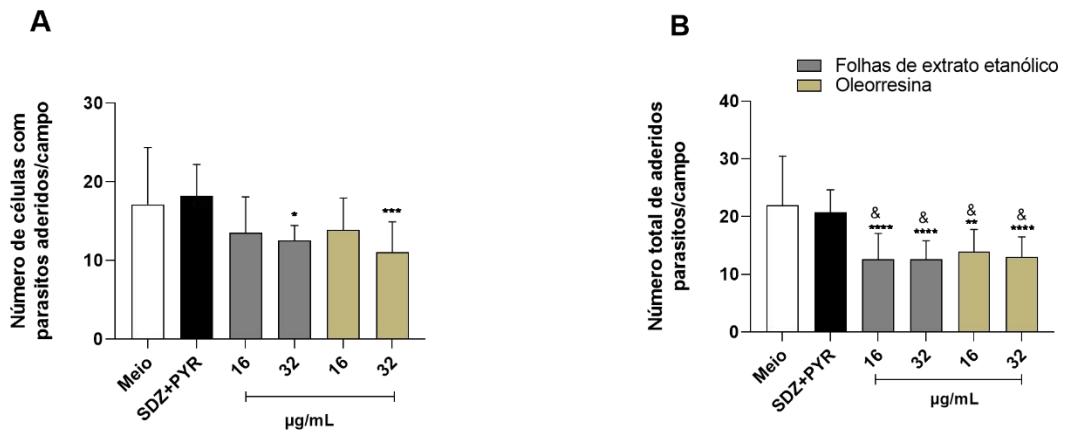


Figura 5. Ensaio de adesão de taquizoítos de *T. gondii* em células HTR8/SVneo.

Os taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 h com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga* e, em seguida, deixados interagir com células HTR8/SVneo previamente fixadas durante 3 h. Como controle, os taquizoítos foram incubados com SDZ + PYR ou apenas meio (meio). O número de células com parasitas aderidos (A) e o número total de parasitas aderidos (B) foram determinados em um total de 20 campos examinados aleatoriamente com lente objetiva de 20X. Imagens representativas destacando o efeito dos tratamentos na interação taquizoíto-célula hospedeira: (C) parasitos não tratados, (D) 16 µg/mL de extrato etanólico, (E) 8 µg/mL de oleorresina e (F) 16 µg/mL de oleorresina. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos realizados em três repetições. Diferenças significativas detectadas pelo One-way ANOVA e pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. **P < 0,001, ***P < 0,0001 ou ****P < 0,00001 em relação ao meio. &P < 0,05 em relação a SDZ + PYR. As setas brancas indicam taquizoítos ligados a células HTR8/SVneo. O núcleo da célula é marcado com TOPRO-3 (azul). Taquizoítos de *T. gondii* marcados com IgG anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (verde). A actina F marcada com faloidina-TRITC é mostrada em vermelho. Barra de escala: 50 µm.

Figura 5

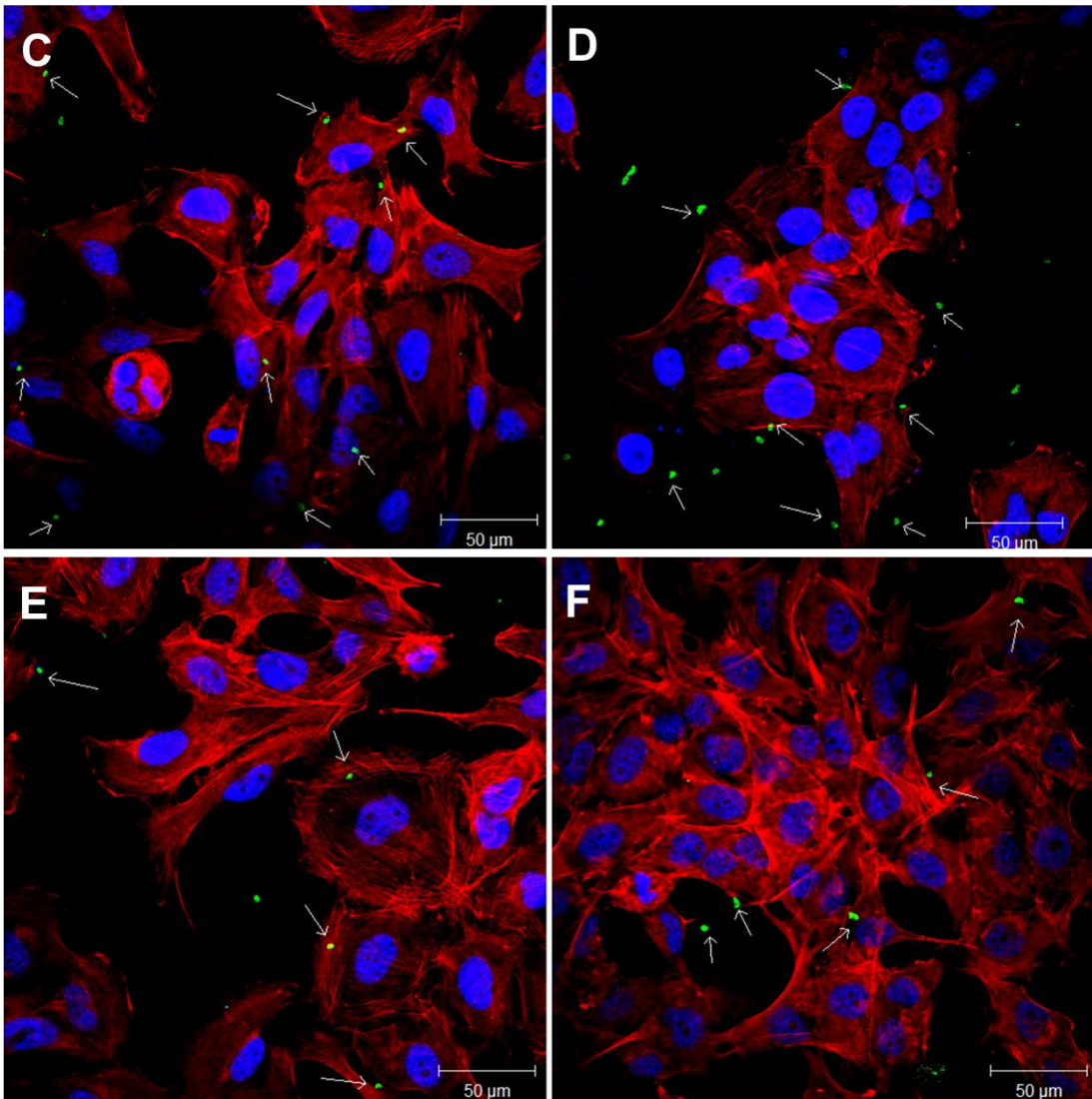
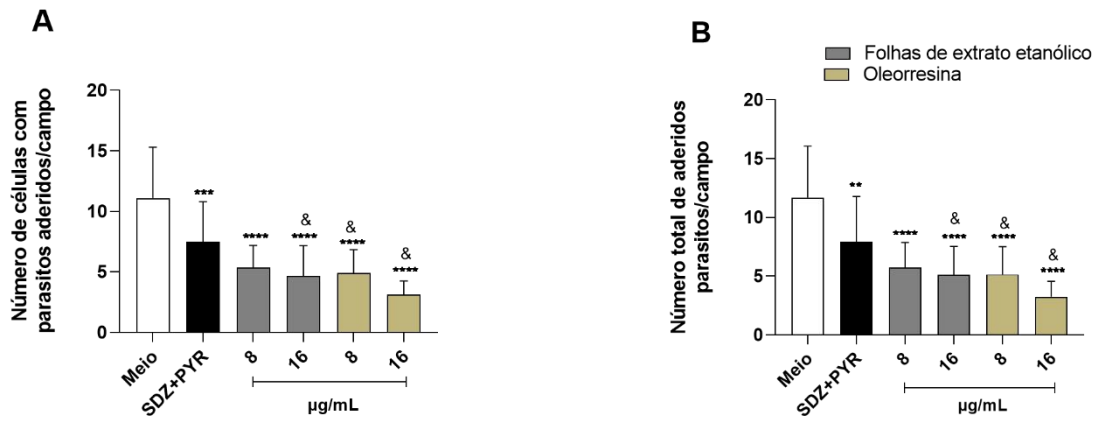
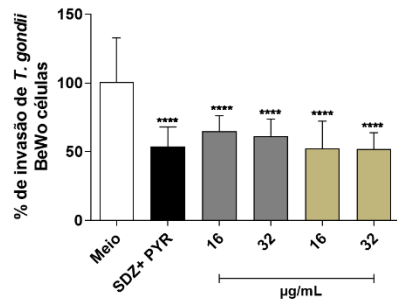


Figura 6. Invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* pré-tratado com extrato etanólico ou oleorresina.

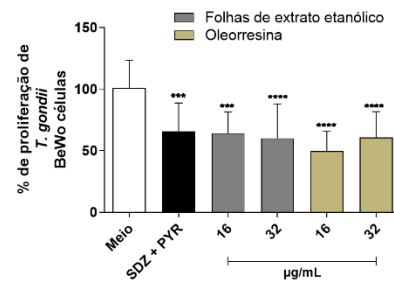
Os taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 h com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga*, e então deixados interagir com células BeWo (A-B) ou HTR8/SVneo (C-D) durante 3 ou 24 h para verificar a invasão e proliferação intracelular. Como controle, os taquizoítos foram incubados com SDZ + PYR ou apenas meio (meio). A % de invasão de *T. gondii* e a % de proliferação de *T. gondii* foram determinadas usando a atividade de β -galactosidase. Parasitos não tratados (médios) foram considerados como 100% de invasão e proliferação. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos realizados em oito repetições. Diferenças significativas detectadas pelo One-way ANOVA e pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. **P < 0,001, ***P < 0,0001 ou ****P < 0,00001 em relação ao meio.

Figura 6

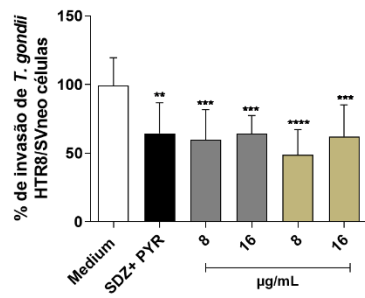
A



B



C



D

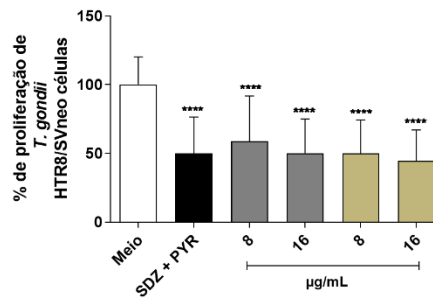


Figura 7. Produção de citocinas e ROS em células BeWo infectadas ou não com *T. gondii* e tratadas com extrato etanólico ou oleorresina.

As células BeWo foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* por 3 h, lavadas para remoção de parasitos extracelulares e tratadas ou não com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga* por 24 h. Células não tratadas e não infectadas (meio), células não tratadas e infectadas (meio Tg) e uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PYR) foram usadas como controles. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e usados para medir IL-6 (A-B), IL-8 (C-D) e MIF (E-F). Paralelamente, células BeWo foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* seguido de tratamento por 24 h com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga*. SDZ + PYR, apenas meio (médio) ou apenas infecção (meio Tg) foram usados como controles. Após, as células foram incubadas com a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H 2 DCF-DA), a produção de ROS foi medida por citometria de fluxo e os dados expressos como intensidade de fluorescência média (MFI) (G-H). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimento realizado em cinco repetições. Diferenças significativas detectadas pelo One-way ANOVA, de Bonferroni, pós-teste de comparações múltiplas. *P < 0,01, **P < 0,001, ***P < 0,0001 ou ****P < 0,00001 em relação ao meio (para células não infectadas) ou ao meio Tg (para células infectadas). &P < 0,05 em relação a SDZ + PYR (para células não infectadas ou infectadas). #P < 0,05 entre meio e meio Tg.

Figura 7

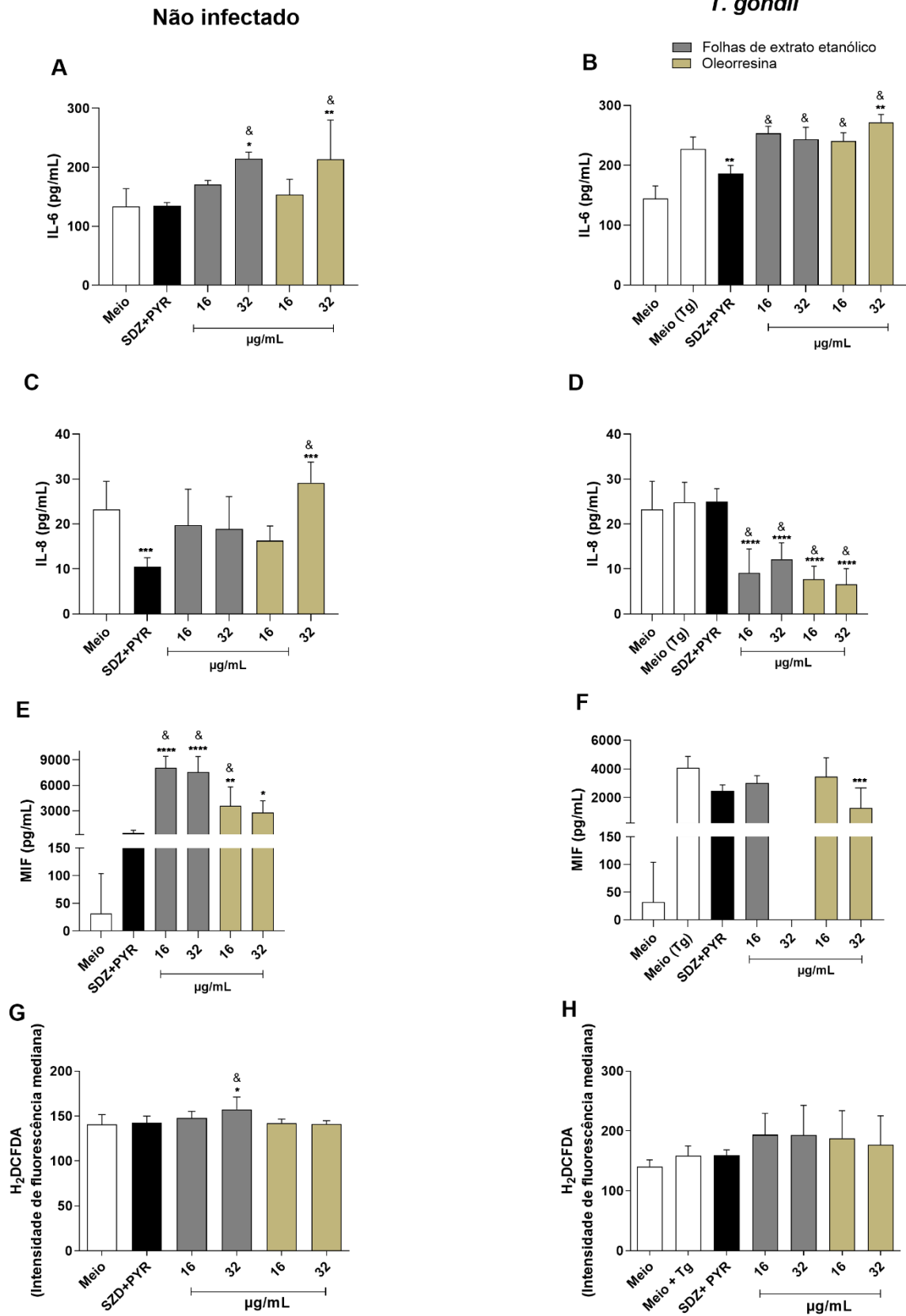


Figura 8. Produção de citocinas e ROS em células HTR8/SVneo infectadas ou não com *T. gondii* e tratadas com extrato etanólico ou oleorresina.

Células HTR8/SVneo foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* por 3 h, lavadas para remoção de parasitas extracelulares e tratadas ou não com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga* por 24 h. Células não tratadas e não infectadas (meio), células não tratadas e infectadas (meio Tg) e uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PYR) foram usadas como controles. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e usados para medir IL-6 (A-B), IL-8 (C-D) e MIF (E-F). Paralelamente, células HTR8/SVneo foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* seguido de tratamento por 24 h com extrato etanólico ou oleorresina de *C. multijuga*. SDZ + PYR, apenas meio (meio) ou apenas infecção (meio Tg) foram usados como controles. Após, as células foram incubadas com a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H 2 DCF-DA), a produção de ROS foi medida por citometria de fluxo e os dados expressos como intensidade de fluorescência média (MFI) (G-H). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimento realizado em cinco repetições. Diferenças significativas detectadas pelo One-way ANOVA, pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *P < 0,01, **P < 0,001, ***P < 0,0001 ou ****P < 0,00001 em relação ao meio (para células não infectadas) ou ao meio Tg (para células infectadas). &P < 0,05 em relação a SDZ + PYR (para células não infectadas ou infectadas). #P < 0,05 entre meio Tg e meio.

Figura 8

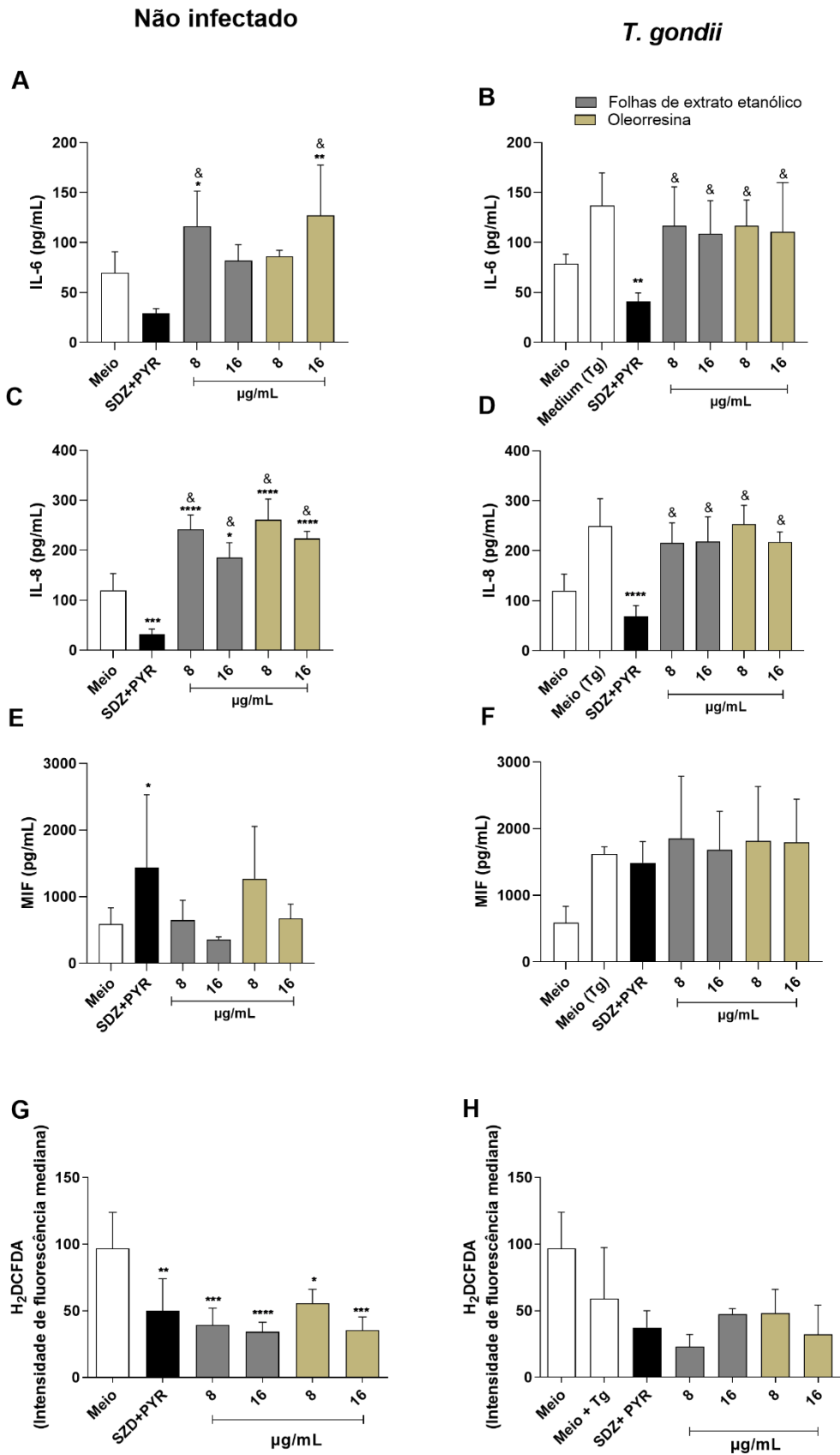


Figura 9. Viabilidade dos vilos coriônicos humanos após os tratamentos.

Os explantes vilosos foram tratados por 24 h com concentrações de (256, 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$), SDZ+PYR (150 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e meio de cultura isolado (grupo controle/grupo não tratado). (A) Ensaios de MTT com explantes de vilosidades e viabilidade tecidual são mostrados em porcentagens (% de viabilidade por incorporação de MTT). (B) os sobrenadantes foram coletados e usados para medir os níveis de LDH (U/L). Fotomicrografias representativas de vilosidades incubadas com meio de cultura (C) sozinho (grupo controle), (D) SDZ + PYR, (E) extrato etanólico, (F) oleorresina, são mostrados nesta figura. As imagens representativas dos tratamentos com oleorresina e extrato etanólico mostram apenas uma concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em oito réplicas. Diferenças significativas detectadas pela One-way ANOVA, pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni estatisticamente significativas quando $P < 0,05$). Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) mostra células sinciciotrofoblásticas (setas pretas) e mesênquima (*). Barra de escala: 50 μm .

Figura 9

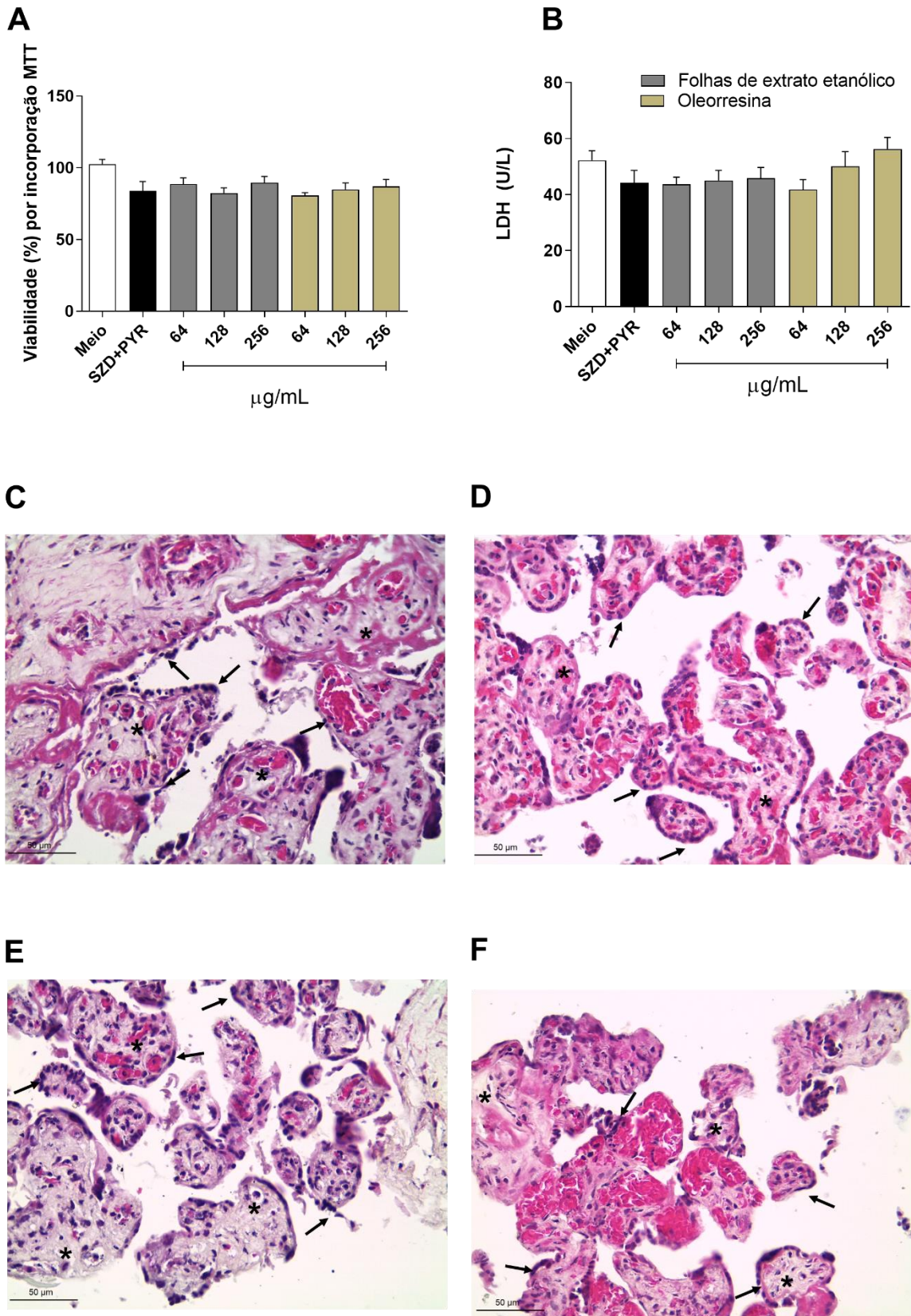
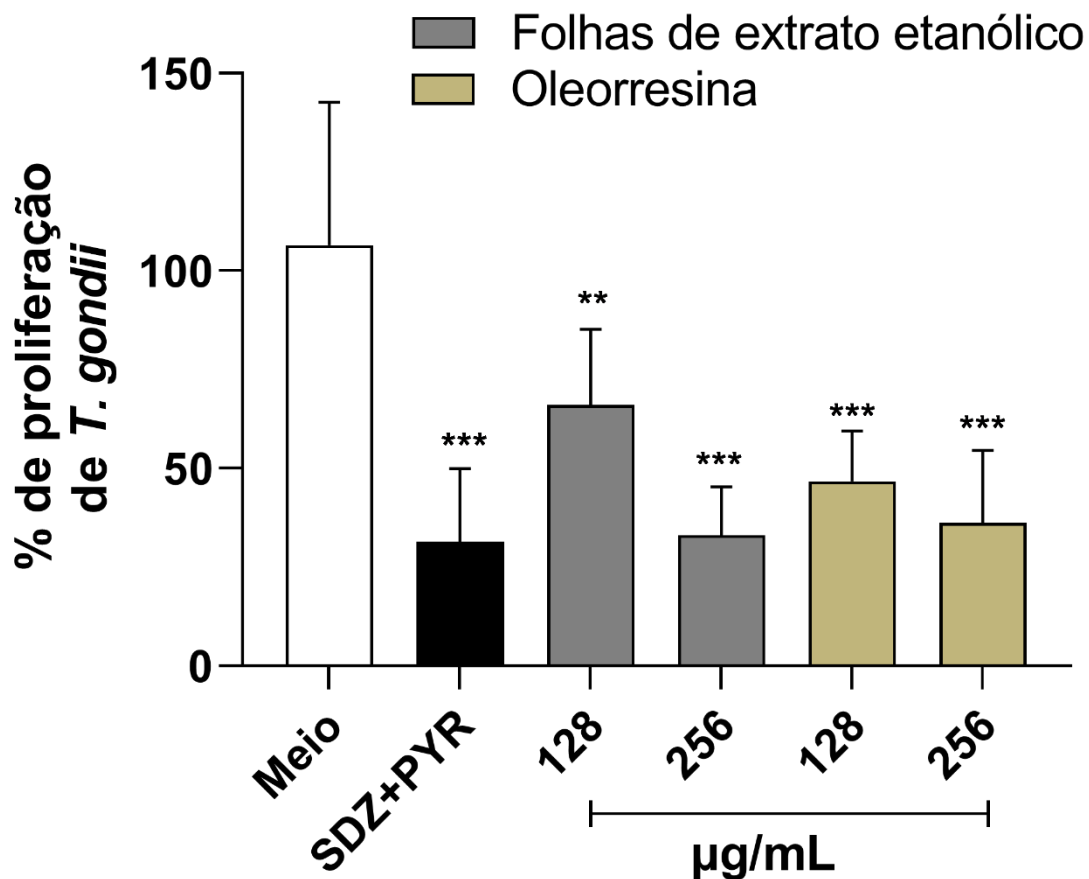


Figura 10. Proliferação intracelular de *T. gondii* em vilos coriônicos humanos infectados.

Os explantes de vilosidades humanas foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* por 24 h, seguido de tratamento por mais 24 h com 256 e 128 $\mu\text{g/mL}$ de oleorresina e extrato etanólico SDZ+PYR (150+200 $\mu\text{g/mL}$) e meio de cultura sozinho (grupo controle/grupo não tratado). A proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilosidades foi medida pelo ensaio de β -galactosidase, e o número de taquizoítos foi expresso em porcentagem (% de proliferação de *T. gondii*), do que o não tratado/infectado (grupo controle) foi considerado como 100% proliferação do parasito. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em seis réplicas. * Comparação entre células infectadas/não tratadas. Diferenças significativas detectadas pela One-way ANOVA, as diferenças pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni foram consideradas quando $P < 0,05$.

Figura 10



8 Referências bibliográficas

- Abugri, D. A., Jaynes, J. M., Witola, W. H. Anti-*Toxoplasma* Activity of *Sorghum Bicolor*-Derived Lipophilic Fractions.” **BMC Research Notes**, vol. 12, no. 1, p. 688, 2019.
- Abbasi, Marjan; Kowalewska-Grochowska, Kinga; Bahar, Mohammad A.; *et al.* Infection of Placental Trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 4, p. 608–616, 2003.
- Ahmadpour, E., Zargami, E., Mahami-Oskouei, M; *et al.* Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women Using Automated Chemiluminescence and Quantitative Real Time PCR. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, vol. 12, no. 1, p. 26, 2019
- Adeyemi, O. S., Murata, Y., Sugi, T., *et al.* Inorganic Nanoparticles Kill *Toxoplasma gondii* via Changes in Redox Status and Mitochondrial Membrane Potential. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 12, pp. 1647–61, 2017.
- Aplin, J. D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. **J. Cell. Sci.**, v. 99, n. 4, p. 681-692, 1991.
- Baptista, Carlos Gustavo; LIS, Agnieszka; Deng, Bowen; *et al.* *Toxoplasma* F-box protein 1 is required for daughter cell scaffold function during parasite replication. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 7, p. e1007946, 2019.
- Barbaresco, A. A. *et al.* Infecções de transmissão vertical em material abortivo e sangue com ênfase em *Toxoplasma gondii*. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2014.
- Barbosa, B. F., Paulesu L, Ietta F; *et al.* “Susceptibility to *Toxoplasma gondii* Proliferation in BeWo Human Trophoblast Cells Is Dose-Dependent of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), via ERK1/2 Phosphorylation and Prostaglandin E2 Production. **Placenta**, vol. 35, no. 3, pp. 152–62, 2014.

Barbosa, B. F. Lopes-Maria, J.B., Gomes, A.O; *et al.* IL10, TGF Beta1, and IFN Gamma Modulate Intracellular Signaling Pathways and Cytokine Production to Control *Toxoplasma gondii* Infection in BeWo Trophoblast Cells1. **Biology of Reproduction**, vol. 92, no. 3, 2015.

Barbosa, B. F; Silva, D. A. O., Costa, I. N; *et al.* BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clin Exp Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008.

Barbosa, Matheus Azevedo; Angelin, Leônidas Gomes; ASAI SAIKAWA, Gustavo Issamu; *et al.* Potenciais alternativas terapêuticas em estudo para a toxoplasmose congênita: uma revisão bibliográfica. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 1–11, 2015.

Bigna, Jean Joel; Tochie, Joel Noutakdie; Tounouga, Dahlia Noelle; *et al.* Global, regional and national estimates of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pregnant women: a protocol for a systematic review and modelling analysis. **BMJ Open**, v. 9, n. 10, p. e030472, 2019.

Borges, I. P., Castanheira, L.U., Barbosa, B. F; *et al.* “Anti-Parasitic Effect on *Toxoplasma gondii* Induced by BnSP-7, a Lys49-Phospholipase A2 Homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, vol. 119, pp. 84–91, 2016.

Borges, Margarida; Magalhães Silva, Tânia; Brito, Carina; *et al.* How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy? **Parasite Immunology**, v. 41, n. 3, p. e12606, 2019.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).

Blader, Ira. J., Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, vol. 69, no. 1, pp. 463–85, 2015.

Blume, Martin; Nitzsche, Richard; Sternberg, Ulrich; *et al.* A *Toxoplasma gondii* Gluconeogenic Enzyme Contributes to Robust Central Carbon Metabolism and Is Essential for Replication and Virulence. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 2, p. 210–220, 2015.

Buzoni-Gatel, Dominique, Schulthess Julie, Menard Laurence C; *et al.* Mucosal Defences against Orally Acquired Protozoan Parasites, Emphasis on *Toxoplasma gondii* Infections. **Cellular Microbiology**, vol. 8, no. 4, pp. 535–44, 2006.

Carlier Y., Truyens, Carine., Deloron, Philippe; *et al.* Congenital Parasitic Infections: A Review. **Acta Tropica**, vol. 121, no. 2, pp. 55–70, 2012.

Carruthers, Vern. B. Host Cell Invasion by the Opportunistic Pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, vol. 81, no. 2, pp. 111–22, 2002.

Castro-Filice, L. S., Barbosa, B. F., Angeloni, M. B; *et al.* Azithromycin Is Able to Control *Toxoplasma gondii* Infection in Human Villous Explants. **Journal of Translational Medicine**, vol. 12, no. 1, p. 132, 2014.

Castro, A. S., Alves C. M. O. S., Angeloni M. B; *et al.* Trophoblast Cells Are Able to Regulate Monocyte Activity to Control *Toxoplasma gondii* Infection. **Placenta**, vol. 34, no. 3, pp. 240–47, 2013.

Castanheira, L., Naves de Souza, D., Silva, R. J; *et al.* Insights into Anti-Parasitism Induced by a C-Type Lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 74, pp. 568–74, 2015.

Caniggia, I., Lye, S. J., & Cross, J. C. Activin Is a Local Regulator of Human Cytotrophoblast Cell Differentiation. **Endocrinology**, 138(9), 3976–3986, 1997.

Ceballos-pomares, J.C.; Cuéllar-rufino, S.; Vazquez-Ortega, M.F.; *et al.* Inmunología de la enfermedad de Chagas congénita. **Perinatología y Reproducción Humana**, v. 31, n. 3, p. 144–150, 2017.

Chaudhry SA, Gad N, Koren G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Can Fam Physician.** 60: 1-3. 2014.

Costa, I. N., Angeloni, M.B., Santana, L.A; *et al.* Azithromycin Inhibits Vertical Transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, vol. 30, no. 10, pp. 884–90, 2009.

Costa, Idessania Nazareth; Ribeiro, Mayara; Silva Franco, Priscila; *et al.* Biogenic Silver Nanoparticles Can Control *Toxoplasma gondii* Infection in Both Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 623947, 2021.

Cascon, V., and B. Gilbert. Characterization of the Chemical Composition of Oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, vol. 55, no. 7, pp. 773–78, 2000.

De Lara da Silva, C. E., Oyama, J., Ferreira, F.B; *et al.* Effect of Essential Oils on *Leishmania amazonensis*: A Systematic Review. **Parasitology**, vol. 147, no. 13, pp. 1392–407, 2020.

De souza, Giovana A.G.; Da silva, Nazaré C.; De souza, Juarez; *et al.* In vitro and in vivo antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. **Phytomedicine**, v. 24, p. 111–118, 2017.

Denkers, E. Y., Butcher, B. A., Del Rio, L., & Kim, L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. **Immunological Reviews**, 201(1), 191–205. 2004.

Denney, C. F., Eckmann, L., & Reed, S. L. Chemokine Secretion of Human Cells in Response to *Toxoplasma gondii* Infection. **Infection and Immunity**, 67(4), 1547–1552. 1999.

- Dhorm P. M. A. R., Tavares, G. D., Soares Rocha, F; *et al.* Effects of Nanoemulsions Prepared with Essential Oils of Copaiba- and Andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Infections. **Experimental Parasitology**, vol. 187, pp. 12–21, 2018.
- Doliwa, C., Escotte-Binet, Sandie., Aubert, Dominique; *et al.* Sulfadiazine Resistance in *Toxoplasma gondii*: No Involvement of Overexpression or Polymorphisms in Genes of Therapeutic Targets and ABC Transporters. *Parasite*, vol. 20, p. 19, 2013.
- Dong, R. and Shan, Z. Interleukin-8: A Critical Chemokine in Biliary Atresia: Interleukin-8 in Biliary Atresia. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, vol. 30, no. 6, pp. 970–76, 2015.
- Dubey, J., and J. Jones. *Toxoplasma gondii* Infection in Humans and Animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, vol. 38, no. 11, pp. 1257–78, 2008.
- Dubey, Jitender P.; Murata, Fernando H.A.; Cerqueira-Cézar, Camila K.; *et al.* Recent epidemiologic and clinical importance of *Toxoplasma gondii* infections in marine mammals: 2009–2020. **Veterinary Parasitology**, v. 288, p. 109296, 2020.
- Dunay, I. R., K. Gajurel, R. Dhakal, O. Liesenfeld, and J. G. Montoya. Treatment of toxoplasmosis: Historical perspective, animal models, and current clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews** 31: e00057–17. 2018.
- Durlach, Ricardo; Freuler, Cristina; Messina, Matías; *et al.* Consenso Argentino de toxoplasmosis congénita 2020. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 81, n. 2, p. 257–268, 2021.
- Dupont, C. D.; Christian, D. A.; Hunter, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p. 793-813, 2012.
- Elsheikha, H. M. Congenital Toxoplasmosis: Priorities for Further Health Promotion Action. **Public Health**, vol. 122, no. 4, pp. 335–53, 2008.

- Fallahi, S.; Rostami, A.; Nourollahpour Shiadeh, M.; *et al.* An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 47, n. 3, p. 133–140, 2018.
- Ferro, E. A. V., Mineo, J. R., Ietta, F; *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Up-Regulated in Human First-Trimester Placenta Stimulated by Soluble Antigen of *Toxoplasma gondii*, Resulting in Increased Monocyte Adhesion on Villous Explants. **The American Journal of Pathology**, 172(1), 50–58. 2008.
- Filisetti, D.; Candolfi, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità*, v. 40, p. 71 - 80, 2004.
- Fitch W., MacKenzie, E. T., Harper, A. Effects of Decreasing Arterial Blood Pressure on Cerebral Blood Flow in the Baboon. Influence of the Sympathetic Nervous System. **Circulation Research**, vol. 37, no. 5, pp. 550–57, 1975.
- Fowler, N. O., McCall, D., Chou, T.C; *et al.* Electrocardiographic Changes and Cardiac Arrhythmias in Patients Receiving Psychotropic Drugs. **The American Journal of Cardiology**, vol. 37, no. 2, pp. 223–30. 1976.
- Franco, P. S., Gois, Paula Suellen Guimarães., de Araújo, T. E; *et al.* Brazilian Strains of *Toxoplasma gondii* Are Controlled by Azithromycin and Modulate Cytokine Production in Human Placental Explants. **Journal of Biomedical Science**, vol. 26, no. 1, p. 10,2019.
- Franco, P. S.; Gomes, A. O.; Barbosa, B. F.; *et al.* Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 838–844, 2011.
- Garcia-Meric, P.; Franck, J.; Dumon, H.; Piarroux, R. [Management of congenital toxoplasmosis in France: current data]. **Presse Med.**, v. 39, n. 5, p. 530-538, 2010.

- Gomes, A. O, Barbosa, B.F., Franco, P.S; *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Prevents Maternal Death, but Contributes to Poor Fetal Outcome During Congenital Toxoplasmosis. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, 2018.
- Gomes, Angelica de Oliveira; Silva, Deise Aparecida de Oliveira; Silva, Neide Maria; *et al.* Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Placental Explants Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on Gestational Age. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 6, p. 2792–2801, 2011.
- Graham, C. H.; Hawley, T. S.; Hawley, R. G.; Macdougall, J. R.; *et al.* Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. **Exp Cell Res.**, v. 206, n. 2, p. 204-211, 1993.
- Habib, F. A. Post-Treatment Assessment of Acute *Toxoplasma* Infection during Pregnancy. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, vol. 28, no. 6, pp. 593–95, 2008.
- Halonen, S. K., and Weiss, L. M. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, vol. 114, Elsevier, pp. 125–45, 2013.
- Hall, C. I., Reese, M. L., Weerapana, E; *et al.* Chemical Genetic Screen Identifies *Toxoplasma* DJ-1 as a Regulator of Parasite Secretion, Attachment, and Invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 108, no. 26, pp. 10568–73, 2011.
- Hampton, M. M. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Neonatal Netw**, v.34, n°5, p.274-278, 2015.
- Huang, Y., Yao Na., He Jia-Kang; *et al.* In Vitro Anti-Parasitic Activity of *Pelargonium X. asperum* Essential Oil Against *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, vol. 9, p. 616340, 2021.
- Hunter, C. A.; Sibley, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effector. **Nat Rev Microbiol.**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2013.

Huppertz, B.; Gauster, M. Trophoblast fusion. **Adv Exp Med Biol.**, v. 713, p. 81-95, 2011.

I. Villena, D. Aubert, B. Leroux; *et al.* Pyrimethamine-Sulfadoxine Treatment of Congenital Toxoplasmosis: Follow-up of 78 Cases Between 1980 and 1997. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, vol. 30, no. 3, pp. 295–300, 1998

Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga-Júnior, V; *et al.* Toxicity of Oleoresins from the Genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: A Comparative Study. **Planta Medica**, vol. 79, no. 11, pp. 952–58, 2013.

Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga, V. F; *et al.* Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 55, no. 7, pp. 2994–3001, 2012.

Jones, J.; Lopes, A.; Wilson, M. Congenital Toxoplasmosis. **Am Fam Physician**, v. 67, p. 2131-2138, 2003.

Khalil, Najeh Maissar; Nascimento, Thuane Castro Frabel do; Casa, Diani Meza; *et al.* Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA–PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 353–360, 2013.

Kian, D., Lancheros, C.A., Assolini, J. P; *et al.* Trypanocidal Activity of Copaiba Oil and Kaurenoic Acid Does Not Depend on Macrophage Killing Machinery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 103, pp. 1294–301, 2018.

Kodjikian, L. Toxoplasmose et grossesse. **Journal Français d’Ophtalmologie**, vol. 33, no. 5, pp. 362–67, 2010.

Koga, K.; Aldo, P. B.; Mor, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, New Haven, v. 35, n° 2, p. 191-202, Apr., 2009.

Körner, H.; McMorran, B.; Schlüter, D.; Fromm, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. **Int J Parasitol**, v. 40, p. 879-88, 2010.

- Lazarin-Bidóia, D., Garcia, F.P., Ueda-Nakamura, T; *et al.* Natural Compounds Based Chemotherapeutic against Chagas Disease and Leishmaniasis: Mitochondrion as a Strategic Target. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 117, p. e220396, 2022.
- Liempi, A.; Castillo, C.; Duaso, J.; Droguett, D.; *et al.* *Trypanosoma Cruzi* induces trophoblast differentiation: a potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1035-1042, 2014.
- Li Xue-Lan, Wei Hai-Xia, Zhang Hao; *et al.* A Meta Analysis on Risks of Adverse Pregnancy Outcomes in *Toxoplasma gondii* Infection. **PLoS ONE**, edited by Dan Zilberstein, vol. 9, no. 5, p. e97775, 2014.
- Ma, X.; Yan, W.; Zheng, H.; *et al.* Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Res.**, v.17, 2015.
- Martiney, J. A., Sherry, B., Metz, C. N., Espinoza, M; *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Release by Macrophages after Ingestion of *Plasmodium chabaudi* -Infected Erythrocytes: Possible Role in the Pathogenesis of Malarial Anemia. **Infection and Immunity**, 68(4), 2259–2267. 2000.
- Mayhew, T. M. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? **Placenta**, v. 35, n. 4, p. 229-240, 2014.
- McLeod, Rima; Boyer, Kenneth M.; Lee, Daniel; *et al.* Prematurity and Severity Are Associated with *Toxoplasma gondii* Alleles (NCCCTS, 1981–2009). **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 11, p. 1595–1605, 2012.
- Melo, Mariane B., Jesen Kirk D. C., Saeij Jeroen P. J. *Toxoplasma gondii* Effectors Are Master Regulators of the Inflammatory Response. **Trends in Parasitology**, vol. 27, no. 11, pp. 487–95, 2011.

- Midgley, A. R.; Pierce, G. B.; Deneau, G. A.; Gosling, J. R. Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. **Science**, v. 141, n. 3578, p. 349-350, 1963.
- Miller, Catherine M., Boulter Nicola R., Ikin Rowan J; *et al.* The Immunobiology of the Innate Response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, vol. 39, no. 1, pp. 23–39, 2009.
- Miller, R. K., Genbacev, O., Turner, M. A., Aplin; *et al.* Human placental explants in culture: Approaches and assessments. **Placenta**, 26(6), 2005, pp 439–448. 2005.
- Miranda, N. C., Araujo, E.C.B., Justino, A.B; *et al.* Anti-Parasitic Activity of *Annona muricata* L. Leaf Ethanolic Extract and Its Fractions against *Toxoplasma gondii* in Vitro and in Vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 273, p. 114019, 2021.
- Moore. K., Sullivan. M. H., Elder. M. G., Moscoso. G., Taylor. K. M. Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 2, n. 90, p. 91-687, 1993.
- Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- Moncada, Pablo A; Montoya, Jose G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 7, p. 815–828, 2012.
- Montazeri, Mahbobeh; Mehrzadi, Saeed; Sharif, Mehdi; *et al.* Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2587, 2018.
- Montoya, J. G., and O. Liesenfeld. Toxoplasmosis. **The Lancet**, vol. 363, no. 9425, pp. 1965–76, 2004.

- Montoya, Jose G., Remington Jack S. Clinical Practice: Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 47, no. 4, pp. 554–66, 2008.
- Moraes, T. S., Leandro, L. F., Santiago, M. B; *et al.* Assessment of the Antibacterial, Antivirulence, and Action Mechanism of *Copaifera pubiflora* Oleoresin and Isolated Compounds against Oral Bacteria. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 129, p. 110467, 2020.
- Oliveira, J. G., Silva, N.M., Santos, A. A. D; *et al.* BeWo Trophoblasts Are Unable to Control Replication of *Toxoplasma gondii*, Even in the Presence of Exogenous IFN- γ . **Placenta**, vol. 27, no. 6, pp. 691–98. 2006.
- Oz, Helieh. S. Toxoplasmosis Complications and Novel Therapeutic Synergism Combination of Diclazuril plus Atovaquone. **Frontiers in Microbiology**, vol. 5, 2014.
- Petersen, E.; Liesenfeld, O. 4 - Clinical Disease and Diagnostics. *In*: Weiss, Louis M.; Kim, Kami (Orgs.). **Toxoplasma Gondii**. p. 81–100. 2007.
- Peyron, F., Leod Rima Mc., Ajzenberg, D; *et al.* Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, no. 2, p. e0005222, 2017.
- Pereira, A. C. A., Silva, R. J., Franco, P. S; *et al.* “Cyclo oxygenase (COX)-2 Inhibitors Reduce *Toxoplasma gondii* Infection and Upregulate the Pro-Inflammatory Immune Response in *Calomys callosus* Rodents and Human Monocyte Cell Line. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, p. 225, 2019.
- Pieri, Fábio Alessandro. Synergistic Activity Between Terpenes from *Copaifera* Genus Against the Etiological Agent of Chagas Disease. **Revista Virtual de Química**, vol. 4, no. 3, 2012.
- Pieri, F. A., Mussi, M. C., Moreira, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera sp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

- Pinheiro, J., Tavares, E., Silva, S; *et al.* Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 11, p. 2388, 2017.
- Pollheimer, J.; Knöfler, M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. **Wien Med Wochenschr.**, v.162, p.187-190, 2012.
- Pourali, Parastoo; Yahyaei, Behrooz. Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 34, p. 22–31, 2016.
- Rajapakse S, Shivanthan MC, Samaranayake N, Chaturaka R, Sumadhya DF. Review Antibiotics for human toxoplasmosis: a systematic review of randomized trials. **Pathogens and Global Health**, v.107, n.4, p.1-8, 2013.
- Ribeiro, M., Franco, P.S., Lopes-Maria Janice Buiate; *et al.* Azithromycin Treatment Is Able to Control the Infection by Two Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Human Trophoblast BeWo Cells. **Experimental Parasitology**, vol. 181, 2017, pp. 111–18, 2017.
- Robert-Gangneux, Florence. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, v. 68, p. S125–S133, 2014.
- Rodrigues, Igor A., et al. Development of Nanoemulsions to Enhance the Antileishmanial Activity of *Copaifera poupera* oleoresins. **BioMed Research International**, v. 2018, Apr. 2018.
- Rorman, E; Zamir, C; Rilkis, I; *et al.* Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458–472, 2006.
- S. Al-Malki, Esam. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 962–969, 2021.

- Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P; *et al.* Effect of Brazilian Copaiba Oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 120, no. 2, pp. 204–08, 2008.
- Santos, A. O., Costa, M.A., Ueda-Nakamura, T; *et al.* *Leishmania amazonensis*: Effects of Oral Treatment with Copaiba Oil in Mice. **Experimental Parasitology**, vol. 129, no. 2, pp. 145–51, 2011.
- Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., et al. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2012, pp. 1–7, 2012.
- Santos, A. O., Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., et al. Antileishmanial Activity of Diterpene Acids in Copaiba Oil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 108, no. 1, pp. 59–64, 2013.
- Scandorieiro, Sara; DE Camargo, Larissa C.; Lancheros, Cesar A. C.; *et al.* Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- Sepúlveda-arias, Juan C.; Gómez-marin, Jorge E.; Bobić, Branko; *et al.* Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6 Pt A, p. 592–601, 2014.
- Sharif, A.A., Unyah, N.Z., Nordin, N; *et al.* Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to Ethanolic Extract of *Tinospora crispa* in Vero Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2019, pp. 1–10. 2019.
- Schlüter, Dirk; Barragan, Antonio. Advances and Challenges in Understanding Cerebral Toxoplasmosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 242, 2019.
- Sharma, S.; Godbole, G.; Modi, D. Decidual control of trophoblast invasion. **Am J Reprod Immunol.**, v.75, p. 341-350, 2016.
- Shrivastava, Siddhartha; Bera, Tanmay; Roy, Arnab; *et al.* Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, n. 22, p. 225103, 2007.

- Silva, R.C.; Langoni, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Research.*, v. 105, p. 893-8, 2009.
- Silva, R. J., Gomes, A.O., Franco, P.S; *et al.* Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from Human Third Trimester Pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 7, 2017.
- Simón, C., Caballero-Campo, P., García-Velasco, J. A., & Pellicer, A. Potential implications of chemokines in reproductive function: an attractive idea. **Journal of Reproductive Immunology**, 38(2), 169–193. 1998.
- Souza, G., Silva, R.J., Milián, I.C.B; *et al.* Cyclooxygenase (COX)-2 Modulates *Toxoplasma gondii* Infection, Immune Response and Lipid Droplets Formation in Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Scientific Reports**, vol. 11, 2021.
- Sommerville, C., Richardson, J. M., Williams, R. A. M; *et al.* Biochemical and Immunological Characterization of *Toxoplasma gondii* Macrophage Migration Inhibitory Factor. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 288, no. 18, 2013, pp. 12733–41, 2013.
- Tamaru, Shunsuke., Kikuchi, Akihiko., Takagi, Kimiyo *et al.* Fetal Therapy of Severe Symptomatic Toxoplasmosis Using Azithromycin: Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, vol. 37, no. 7, pp. 953–57, 2011.
- Tardieux, Isabelle; BAUM, Jake. Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. **Journal of Cell Biology**, v. 214, n. 5, p. 507–515, 2016.
- Teixeira, S. C., de Souza, G., Borges, B.C; *et al.* “*Copaifera spp.* Oleoresins Impair *Toxoplasma gondii* Infection in Both Human Trophoblastic Cells and Human Placental Explants. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, Sept., p. 15158, 2020.

- Teixeira, S. C., Silva, R.J., Lopes-Maria Janice B; *et al.* Transforming Growth Factor (TGF) -B1 and Interferon (IFN)- γ Differentially Regulate ICAM-1 Expression and Adhesion of *Toxoplasma gondii* to Human Trophoblast (BeWo) and Uterine Cervical (HeLa) Cells. *Acta Tropica*, vol. 224, p. 106111, 2021.
- Tong, Wen Han; Pavey, Chris; O’Handley, Ryan; *et al.* Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 77, 2021.
- Tomani, J. C. D., Bonnet, O., Nyirimigabo, A., *et al.* “In Vitro Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Compounds from the Roots of *Eriosema montanum* Baker f. (Fabaceae).” *Molecules*, vol. 26, no. 9, p. 2795, 2021.
- Torres-Sangiao, Eva; Holban, Alina; Gestal, Monica. Advanced Nanobiomaterials: Vaccines, Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 867, 2016.
- Vaidya, S. S., Walsh, S. W., & Gerk, P. M. Application of Human Placental Villous Tissue Explants to Study ABC Transporter Mediated Efflux of 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathione. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 12(5), 814–823. 2011.
- Veiga, J. Valdir F., Pinto, Angelo C. O gênero Copaifera L. **Química Nova**, vol. 25, pp. 273–86, 2002.
- Wallon, M.; Cozon, G.; Ecochard, R.; Lewin, P.; Peyron, F. Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. **Eur J Pediatr.**, v. 160, n. 9, p. 534-540, 2001.
- Wolfe, M. W. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. **Methods Mol Med.**, v. 121, p. 229-239, 2006.
- Zhang, Y., Lai Bo, Shuin, Juhas Mario; *et al.* *Toxoplasma gondii* Secretory Proteins and Their Role in Invasion and Pathogenesis. **Microbiological Research**, vol. 227, p. 126293, 2019.

Zourbas, S., Dubanchet, S., Martal, J., & Chaouat, G. Localization of pro-inflammatory (IL-12, IL-15) and anti-inflammatory (IL-11, IL-13) cytokines at the foetomaternal interface during murine pregnancy. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 126, n.(3), p. 519–528. 2002.