

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação da atividade funcional das própolis brasileiras marrom, verde e vermelha e seus compostos isolados na infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas

Gabriel Nogueira Melo

Uberlândia-MG

Dezembro, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação da atividade funcional das própolis brasileiras marrom, verde e vermelha e seus compostos isolados na infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas

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

Aluno: Gabriel Nogueira Melo

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Coorientador: Dr. Samuel Cota Teixeira

Uberlândia-MG

Dezembro, 2022

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

M528 2022	<p>Melo, Gabriel Nogueira, 1998- Avaliação da atividade funcional das própolis brasileiras marrom, verde e vermelha e seus compostos isolados na infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas [recurso eletrônico] / Gabriel Nogueira Melo. - 2022.</p> <p>Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro. Coorientador: Samuel 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.2022.643 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira, 1964-, (Orient.). II. Teixeira, Samuel Cota, 1993-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado nº 285				
Data:	22/12/2022	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	12022IPA002				
Nome do Discente:	Gabriel Nogueira Melo				
Título do Trabalho:	Avaliação da atividade funcional das própolis brasileiras marrom, verde e vermelha e seus compostos isolados na infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de Patógenos Causadores de Doenças Infecciosas e Parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização do Comportamento das Células Trofoblásticas Frente a Transmissão Congênita de <i>Toxoplasma gondii</i>				

Reuniu-se no dia 22 de dezembro de 2022, 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: Bellisa de Freitas Barbosa - ICBIM/PPIPA/UFU; Angelica de Oliveira Gomes - UFTM/ICBN; Eloisa Amália Vieira Ferro - ICBIM/PPIPA/UFU (Presidente) orientadora do candidato. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro, apresentou a Comissão Examinadora, e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) 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):

APROVADA(O).

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Eloisa Amália Vieira Ferro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 16:24, 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 **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 16:25, 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 **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 22/12/2022, às 16:26, 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 **4116617** e o código CRC **CE9FC81F**.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e a Toxoplasmose congênita	5
1.2 Placenta humana e populações celulares	5
1.3 Trofoblasto Extraviloso.....	6
1.4 Tratamento da toxoplasmose congênita	7
1.5 Própolis: considerações gerais.....	8
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo geral.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Cultura de células HTR-8/SVneo.....	11
4.2 Cultivo e manutenção da cepa RH (clone 2F1) de <i>T. gondii</i>	11
4.3 Coleta das própolis marrom, verde e vermelha.....	11
4.4 Teste de viabilidade celular	12
4.5 Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> por β -galactosidase.....	12
4.6 Ensaio de reversibilidade	13
4.7 Pré-tratamento das células HTR-8/Svneo e dos parasitos.....	13
4.8 Avaliação da migração horizontal de células HTR-8/SVneo.....	14
4.9 Análise estatística.....	15
5. RESULTADOS	16
5.1 Tratamentos com altas concentrações das própolis marrom, verde e vermelha alteraram a viabilidade de células HTR-8/SVneo	16
5.2 Os extratos bruto das própolis reduziram significativamente a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células HTR-8/SVneo	17
5.3 As própolis exibiram uma ação antiparasitária parcialmente irreversível dependente da concentração.....	18
5.4 Pré-tratamento de taquizoítos do <i>T. gondii</i> com própolis prejudica a invasão a células HTR-8/SVneo	19
5.5 Baixas concentrações de própolis recuperaram a capacidade de migração horizontal de células HTR-8/SVneo infectadas	20
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
ANEXOS.....	37

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa natural produzida por abelhas e, devido às suas propriedades biológicas, tem sido utilizada como medicina alternativa. Pesquisas recentes têm demonstrado que a própolis pode afetar o processo inflamatório, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo coadjuvante no controle de doenças parasitárias, além de promover a proliferação, migração e viabilidade celular. O controle da infecção por *T. gondii* é essencial para o sucesso gestacional, por isso é necessário a busca de novas alternativas terapêuticas não tóxicas para o tratamento da toxoplasmose congênita. Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das própolis brasileiras marrom, verde e vermelha na infecção por *T. gondii* em células trofobásticas humanas extravilosas (HTR-8/SVneo). As células HTR-8/SVneo foram infectadas com *T. gondii* e tratadas com os extratos de própolis. Os três extratos de própolis mostraram habilidade em promover a redução da proliferação intracelular parasitária e prejudicaram a invasão do parasito em células HTR-8/SVneo. Além disso, os diferentes extratos exibiram um efeito antiparasitário de maneira dose dependente. Nossos resultados sugerem que os extratos brutos de própolis marrom, verde e vermelha interferem nos mecanismos de invasão e proliferação intracelular do parasito, enquanto não altera o processo de migração do trofoblasto extraviloso.

Palavras-chave: Própolis; *Toxoplasma gondii*; Infecção placentária; Tratamento alternativo; Trofoblasto extraviloso

ABSTRACT

Propolis is a natural resinous substance produced by bees and, due to its biological properties, it has been used as an alternative medicine. Recent research has shown that propolis can affect the inflammatory process, decreasing the production of pro-inflammatory cytokines, being an adjuvant in the control of parasitic diseases, in addition to promoting cell proliferation, migration and viability. The control of *T. gondii* infection is essential for pregnancy success, so it is necessary to search for new non-toxic therapeutic alternatives for the treatment of congenital toxoplasmosis. This study aimed to evaluate the effects of Brazilian brown, green and red propolis on *T. gondii* infection in extravillous human trophoblastic cells (HTR-8/Svneo). HTR-8/SVneo cells were infected with *T. gondii* and treated with propolis extracts. The three propolis extracts showed ability to promote the reduction of parasitic intracellular proliferation and impaired the parasite invasion in HTR-8/SVneo cells. In addition, the different extracts exhibited an antiparasitic effect in a dose-dependent manner. Our results suggest that the raw extracts of brown, green and red propolis interfere with the mechanisms of invasion and intracellular proliferation of the parasite, while not altering the migration process of the extravillous trophoblast.

Keywords: Propolis; *Toxoplasma gondii*; Placental infection; Alternative treatment; extravillous trophoblast

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii* e a Toxoplasmose congênita

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório e o agente etiológico da toxoplasmose, uma das doenças zoonóticas mais comum em todo o mundo, acometendo mais de um terço da população mundial (DUBEY et al., 2012; HIDE, 2016). Os seres humanos podem ser infectados com *T. gondii* pela ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais, água ou alimentos contendo oocistos excretados nas fezes de felinos infectados, e congenitamente através da passagem transplacentária da mãe para o feto (MONTROYA, LIENSENFELD, 2004; ELSALAM et al., 2021). A infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes geralmente é assintomática, no entanto, em indivíduos imunocomprometidos ou infectados congenitamente podem ocorrer uma ampla variedade de sintomas neurológicos, mortalidade neonatal e abortos (ARRANZ-SOLÍS et al., 2021).

Uma gestação bem-sucedida depende de modificações imunológicas que proporcionam um processo dinâmico com diferentes estágios imunológicos que modulam uma resposta imune tolerante em todos os estágios embrionários (ZHAO et al., 2016). O estabelecimento desse microambiente mais tolerogênico torna as gestantes mais suscetíveis à infecções, pois a resposta imune adequada contra patógenos intracelulares, como o *T. gondii* é, principalmente, celular e pró-inflamatória (MERCER et al., 2020; MUKHOPADHYAY et al., 2020). Uma vez que *T. gondii* atinge ambientes tolerogênicos, como a placenta, ocorre a diminuição nos níveis de células T reguladoras e TGF- β na interface materno-fetal e gera uma resposta imune exacerbada, podendo causar complicações clínicas graves como morte fetal, aborto, malformação congênita, danos neurológicos e oculares (FALLAHI et al., 2018; GÓMES-CHÁVEZ et al., 2020). Estima-se que a incidência global de toxoplasmose congênita seja de 190.100 casos por ano, o que corresponde a uma taxa de incidência aproximada de 1,5 casos a cada 1000 nascidos vivos (TORGERSON, MASTROIACOVO, 2013)

1.2 Placenta humana e populações celulares

O trofoblasto é uma população celular que constitui a interface materno-fetal responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio, nutrição do embrião e formação da parte fetal da placenta (WHARTON et al., 1993; FITZGERALD et al., 2008).

Durante o processo de implantação, esse trofoblasto se diferencia em duas subpopulações: o citotrofoblasto e o sinciotrofoblasto (WHARTON et al., 1993). O sinciotrofoblasto é uma camada de células multinucleadas que reveste a superfície mais externa das vilosidades da placenta humana e atua como barreira celular entre o ambiente fetal e o sangue materno (HUPPERTZ; GAUSTER, 2011; MAYHEW, 2014). O citotrofoblasto é uma camada interna de células individualizadas com alta capacidade proliferativa que podem fundir-se para formar a camada de sinciotrofoblasto (KELLAM, WEISS, 2019). Além disso, o citotrofoblasto pode ser dividido em trofoblasto viloso, importante para a troca de nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto, e trofoblasto extraviloso, responsável pela migração e invasão na decídua (CHANG et al., 2018; LI et al., 2021). Na placenta humana, o sinciotrofoblasto é diretamente banhado pelo sangue materno presente no espaço interviloso, delimitado pela placa coriônica (parte fetal) e a decídua basal (parte materna da placenta) (KELLAM, WEISS, 2019). Portanto, uma vez que o espaço interviloso é preenchido pelo sangue materno, a placenta fica exposta à patógenos que podem estar presentes na circulação materna, como *T. gondii*.

1.3 Trofoblasto Extraviloso

O trofoblasto extraviloso é essencialmente dividido em pelo menos dois tipos: trofoblasto extraviloso intersticial que invade profundamente a parede uterina e o trofoblasto extraviloso endovascular que remodela e alinha as arteríolas deciduais (LYALL et al., 2013; FARAH et al., 2020). Ambas populações de trofoblastos extravilosos estão diretamente associados com o aumento do diâmetro do vaso e a diminuição da resistência do fluxo sanguíneo, uma vez que promovem o remodelamento das artérias espiraladas, permitindo maior fluxo de sangue para o espaço interviloso, conduzindo uma abundância de nutrientes para a interface materno-fetal (REDMAN, SARGENT, 2010; CHAMLEY et al., 2014; GATHIRAM, MOODLEY, 2016). O remodelamento e a dilatação das artérias espiraladas maternas são mecanismos essenciais para garantir o sucesso no desenvolvimento do feto, pois reduzem a velocidade e pressão do fluxo sanguíneo materno-placentário e aumentam a perfusão uteroplacentária, para atender às necessidades do feto em desenvolvimento (ABBAS et al., 2020). A invasão inadequada do trofoblasto extraviloso mantém as artérias estreitas em sua abertura no espaço interviloso, o que aumenta a velocidade do fluxo do sangue materno e estabelece uma circulação turbulenta, podendo alterar a estrutura das vilosidades e comprometer a função placentária

(KINGDOM et al., 2018; ALBRECHT, PEPE, 2020). Os distúrbios do desenvolvimento placentário ocorrem em função do suprimento insuficiente de sangue materno para suprir as necessidades do feto e estão associados a síndromes obstétricas como natimorto, restrição de crescimento fetal e pré-eclâmpsia, (GATHIRAM, MOODLEY, 2016; FARAH et al., 2020).

A população de células do trofoblasto extraviloso quando comparadas as células do trofoblasto viloso e do sinciciotrofoblasto demonstraram ser mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* (OLIVEIRA et al., 2021). Além disso, outros estudos indicam que a camada de sinciciotrofoblasto forma uma barreira eficaz contra a invasão de patógenos intracelulares, como *T. gondii* (ROBBINS et al., 2012); e sugerem que os trofoblastos extravilosos são uma via de acesso ao compartimento fetal por *T. gondii*, que ocorre sem infectar o sinciciotrofoblasto (COYNE, LAZEAR, 2016). A gravidade da doença e a taxa de infecção são inversamente proporcionais ao período gestacional. No caso de infecções no primeiro trimestre gestacional ocorrem lesões graves para o feto, enquanto a probabilidade de infecção fetal tende a ser maior no final da gestação (WALLON et al., 2013; VILLARD et al., 2016).

1.4 Tratamento da toxoplasmose congênita

O tratamento padrão para a toxoplasmose congênita consiste na combinação de sulfadiazina e pirimetamina, os quais atuam sinergicamente para inibir a proliferação e sobrevivência de *T. gondii* por meio da inibição da via biossintética do folato (ASPÖCK, 2000; MONTOYA, LIENSENFELD, 2004; CUERVO et al., 2016). O tratamento com pirimetamina não é recomendado durante o primeiro trimestre de gestação por causar efeitos teratogênicos e ainda pode prejudicar a atividade da medula óssea (MONTOYA, REMINGTON, 2008; OZ, 2014). Em geral, os pacientes não são tolerantes à sulfadiazina e quando administrada por um longo período, podendo causar problemas gastrointestinais fazendo com que o tratamento seja descontinuado (MARTINS-DUARTE et al., 2015). Além disso, tem sido sugerido na literatura a existência de cepas resistentes aos medicamentos convencionais, que gera um agravante no uso do tratamento clássico e preocupação não apenas com as limitações do tratamento, mas também com o aumento da gravidade do desfecho clínico (MENECEUR et al., 2008; MONTAZERI et al., 2018).

1.5 Própolis: considerações gerais

A própolis é uma substância resinosa natural produzida por abelhas *Apis mellifera* a partir de diferentes exsudatos vegetais que podem ser encontradas na América do Sul, América Central, África, Sudeste Asiático e na Oceania do Norte (CHEN et al., 2018; HRNCIR et al., 2016). A própolis é uma mistura complexa, de compostos derivados de plantas, constituída por 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de compostos orgânicos, sua função é proteger as colméias contra outros insetos e microrganismos (BURDOCK, 1998; PARK et al., 2002; PIETTA et al., 2002; RUFATTO et al., 2017). No Brasil, existem 14 tipos de extrato de própolis descritos e classificados de acordo com a sua origem botânica, propriedades físico-químicas e localização geográfica (PARK et al., 2002; FERREIRA et al., 2017). Os três principais tipos de própolis encontrados no Brasil são: (i) própolis verde - tem como principal fonte botânica a *Baccharis dracunculifolia* (RODRIGUES et al., 2020); (ii) própolis marrom - que possui fonte botânica variável como *Vernonia* spp. (Asteraceae), *Piptadenia falcate* Benth (Fabaceae) e *Luehea* sp. (Malvaceae) (GOMES et al., 2016); (iii) própolis vermelha - que é coletada por abelhas em exsudatos resinosos vermelhos na superfície e orifício no ramo de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae) (DAUGSCH et al., 2008).

Diferentes própolis têm apresentado atividade contra patógenos associados à doenças em humanos. Nesse sentido, foi demonstrado que própolis apresentaram efeito antiparasitário contra *Giardia lamblia* (TORRES et al., 1990), *Trichomonas vaginalis* (DE OLIVEIRA-DEMOGURKI et al., 2018), *Leishmania braziliensis* (REBOUÇAS-SILVA et al., 2017), *Trypanosoma cruzi* (SALOMÃO et al., 2011) e *Plasmodium falciparum* (AFROUZAN et al., 2017). O uso da própolis tem atraído grande interesse por suas inúmeras atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, antiproliferativa, anti-inflamatória e antiparasitária (DE MENDONÇA et al., 2015; FREIRES et al., 2016).

Diante de todo o potencial farmacológico demonstrado pelas própolis somado à alta susceptibilidade do trofoblasto extraviloso frente à infecção por *T. gondii*, esse trabalho investigou o impacto de própolis brasileiras no controle da infecção experimental por *T. gondii*, utilizando o trofoblasto extraviloso (linhagem HTR- 8/SVneo) como modelo experimental, bem como sua influência na capacidade de migração celular.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é uma doença de alta incidência global que possui uma pluralidade de manifestações clínicas que afetam as gestantes, o feto e crianças. Embora existam drogas para o tratamento da doença, os fármacos atualmente utilizados são tóxicos e causam efeitos colaterais tanto nas gestantes quanto no feto. Além disso, o tratamento tradicional não é capaz de eliminar completamente a infecção. Dessa forma, faz-se necessário a busca de alternativas terapêuticas com baixa toxicidade e que, ao mesmo tempo, sejam capazes de reduzir a transmissão vertical do parasita e que não interfiram no curso do desenvolvimento fetal.

Historicamente, os produtos naturais e seus compostos têm sido fontes produtivas para o tratamento de doenças infecciosas. Estudos recentes têm enfatizado a medicina alternativa contra o manejo de doenças parasitárias, como *T. gondii* (SHARIF et al., 2016; EL-TANTAWY et al., 2018). Neste sentido, propomos aqui a utilização da própolis no controle da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas (HTR-8/Svneo).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o impacto do tratamento com as própolis brasileiras, produzidas por abelhas *Apis mellifera* obtidas de diferentes fontes botânicas na modulação da infecção por *T. gondii* em modelos de interface materno-fetal, bem como investigar a influência destes extratos brutos nos mecanismos de proliferação e invasão de *T. gondii*, e migração de células trofoblásticas humanas extravilosas (HTR-8/SVneo) infectadas ou não por *T. gondii*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial citotóxico das própolis marrom, verde e vermelha sobre o trofoblasto humano extraviloso (linhagem HTR-8/SVneo);
- Investigar o efeito do extrato de própolis na proliferação intracelular e invasão de taquizoítos de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo;
- Determinar a concentração mais eficiente de própolis no controle da infecção por *T. gondii*;
- Avaliar o impacto da própolis na migração de células HTR-8/SVneo não infectadas e infectadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células HTR-8/SVneo

Células trofoblásticas humanas extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo) foram cedidas pela professora Dra. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP, Brasil) e mantidas no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e antibióticos (10.000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2014; DA SILVA et al., 2017).

4.2 Cultivo e manutenção da cepa RH (clone 2F1) de *T. gondii*

Taquizoítos de *T. gondii*, clone 2F1, que são derivados da cepa altamente virulenta RH e que expressam constitutivamente o gene da enzima β-galactosidase, foram cedidos pelo Professor Dr. Vern Carruthers, da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Taquizoítos foram cultivados em células HTR8/SVneo e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB a 37° C e 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2014).

4.3 Coleta das própolis marrom, verde e vermelha

As amostras de própolis marrom, verde e vermelha foram cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Em linhas gerais, as três amostras de própolis foram obtidas pela ApisFlora (Ribeirão Preto-SP) e coletadas juntamente com amostras de plantas em São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Santa Catarina. Em São Paulo foi coletada própolis marrom de *Eucalyptus* na Cidade de Luiz Antônio, nas vizinhanças do horto da FEPASA. Em Minas Gerais na região de Bambuí foram coletadas própolis verde da sua fonte botânica *B. dracunculifolia* e na cidade de Cabo Verde foi coletada própolis marrom produzida a partir de *Morus Alba*. Na Bahia, a própolis vermelha e sua fonte botânica *Dalbergia* foram coletadas em apiários localizados na cidade de Canavieiras. Em Santa

Catarina foram coletadas própolis marrom a partir de Araucárias, por meio da Associação de Apicultores do Estado de Santa Catarina.

4.4 Teste de viabilidade celular

A viabilidade da células HTR-8/SVneo frente ao tratamento com a própolis verde, vermelha e marrom foi definida através do ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983). Células HTR-8/SVneo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, homogeneizadas em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer e calculadas para uma proporção de $1,5 \times 10^4$ células a cada 200 μ l de meio, por poço, a 10% de SFB em placas de cultura de 96 poços. Após 24 h em estufa a 37° C e 5% de CO₂, as células foram tratadas com três diferentes extratos brutos de própolis solubilizadas com dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas seriadamente de 1:2 de 4 a 512 μ g/mL por 24 h em meio a 10% de SFB (TEIXEIRA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017, TEIXEIRA et al., 2019; PÉREZ-BRANDÁN et al., 2019), também foi verificada a citotoxicidade do DMSO. Como controle de viabilidade celular, as células foram cultivadas somente com meio 10% SFB.

Posteriormente, as células foram incubadas com 10 μ l de MTT (5 mg/mL) acrescido de 90 μ L de meio a 10% de SFB em estufa durante 4 h. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e os cristais formados solubilizados com 100 μ L de solução contendo SDS a 10% e N, N-dimetil formamida a 50% (MOSMANN, 1983). Após 30 min de incubação, foi obtida a densidade ótica (DO) a 570nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA) e os resultados foram expressos como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação ao controle (100%). Três experimentos independentes em oito réplicas foram realizados.

4.5 Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* por β -galactosidase

A proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo frente ao tratamento com a própolis foi verificada através da reação de β -galactosidase (DA SILVA et al., 2017). Após 24 h de plaqueamento, as células foram infectadas por 3 h com taquizoítos de *T. gondii* em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1 (3 parasitos: 1 célula) em meio RPMI 1640 suplementado a 2 % SFB, lavadas e tratadas ou não por 24 h

em meio RPMI 1640, suplementado a 10 % SFB, com concentrações não tóxicas (definidas pelo teste de MTT) das própolis e, também com a combinação de sulfadiazina a 100 µg/ml e pirimetamina a 4µg/ml (S+P), que são o tratamento convencional, em uma concentração não tóxica pré-estabelecida (COSTA et al., 2021). Em seguida, as placas foram submetidas ao ensaio de β-galactosidase. Como controle positivo de crescimento parasitário, as células foram infectadas e cultivadas apenas com meio de cultura. A proliferação intracelular de *T. gondii* (número de taquizoítos) foi obtida de acordo com uma curva de referência contendo taquizoítos livres (de 1×10^6 a $15,6 \times 10^3$). Os dados foram expressos em % de proliferação do *T. gondii*, considerando que o número médio de taquizoítos dos controles (células não tratadas e infectadas) corresponde a 100% de proliferação do parasito, o número de taquizoítos de cada condição de tratamento também foi transformado em porcentagem de acordo com a % da proliferação do parasito utilizado como controle. Três experimentos independentes em oito réplicas foram realizados.

4.6 Ensaio de reversibilidade

A reversibilidade aos tratamentos por *T. gondii* em células HTR-8/SVneo também foi verificada pela da reação de β-galactosidase (TEIXEIRA et al., 2020). Células HTR-8/SVneo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, homogeneizadas em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer e calculadas para uma proporção de $1,5 \times 10^4$ células a cada 200 µl de meio a 10% de SFB e plaqueadas em placa de cultura de 96 poços. Após a adesão celular, as células foram infectadas, nas mesmas condições do item 4.5. Após três horas de invasão foram testadas duas condições experimentais: na primeira, os parasitas que invadiram foram deixados para crescer na presença dos tratamentos nas maiores e menores concentrações não tóxicas das própolis por 24 h; na segunda condição, os parasitas que invadiram foram cultivados nas mesmas condições, porém, após 24 h de tratamento, as células foram lavadas, o meio substituído por RPMI a 10% SFB, e a placa incubada por mais 24 h. Em seguida, as placas foram submetidas ao ensaio de β-galactosidase. Por fim, medimos a taxa de reversibilidade em porcentagem (reversibilidade do tratamento %) em 24 h após a remoção do tratamento em comparação com o grupo não tratado e a condição de tratamento correspondente em 24 h de tratamento. Três experimentos independentes em oito réplicas foram realizados.

4.7 Pré-tratamento das células HTR-8/Svneo e dos parasitos

Foi realizado o pré-tratamento das células ou dos parasitos com os extratos de própolis e o tratamento convencional para verificar se os tratamentos controlariam a invasão por exercer atividade na célula, parasito, ou em ambos. Células HTR-8/SVneo foram retiradas dos frascos de cultura, centrifugadas, homogeneizadas em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer e calculadas para uma proporção de $1,5 \times 10^4$ células a cada 200 μ l de meio a 10% de SFB e plaqueadas em placa de cultura de 96 poços. Na primeira abordagem experimental, após a adesão celular, as células foram pré-tratadas nas maiores e menores concentrações não tóxicas de cada própolis ou não por 24h. Após, os tratamentos foram retirados e os poços lavados com meio incompleto e, em seguida, as células foram infectadas nas condições mencionadas no item 4.5. Na segunda abordagem experimental, parasitos foram pré-tratados nas maiores e menores concentrações não tóxicas de cada própolis ou não por 1h dentro de tubos eppendorf de 1,5mL em estufa a 37° C e 5% de CO₂, lavados, e então deixados para invadir as células HTR-8/SVneo por 3h. Em seguida, ambas placas foram submetidas ao ensaio de β -galactosidase. A invasão de *T. gondii* (número de taquizoítos) foi obtida de acordo com uma curva de referência contendo taquizoítos livres (de 1×10^6 a $15,6 \times 10^3$). Os dados foram expressos em % de invasão do *T. gondii*, considerando que o número médio de taquizoítos dos controles (células não tratadas e infectadas) corresponde a 100% de invasão do parasito, o número de taquizoítos de cada condição de tratamento também foi transformado em porcentagem de acordo com a % da invasão do parasito utilizado como controle. Três experimentos independentes em oito réplicas foram realizados.

4.8 Avaliação da migração horizontal de células HTR-8/SVneo

Para avaliar o impacto da infecção e dos tratamentos com a própolis na migração celular, foi realizado o ensaio de *wound healing* (LANG et al., 2007; Yue et al., 2010; JUSTUS et al., 2014). Para o ensaio de migração horizontal (*wound healing*), células HTR-8/SVneo ($0,7 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em placa de 24 poços e cultivadas até confluência de aproximadamente 95% em estufa a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas, ou não, por 3 h com taquizoítos de *T. gondii* em MOI de 3:1 em meio RPMI 1640 suplementado. Após esse período, os poços foram lavados para que o excesso

de parasitos não internalizados fosse removido. Posteriormente, foi realizado o risco com o auxílio de uma ponteira de 10 μL , sobre a monocamada de células, no sentido de estabelecer uma abertura na monocamada de células para posterior avaliação da migração. Em seguida, os poços foram lavados com meio RPMI incompleto para a remoção das células do sobrenadante. As células foram cultivadas na ausência ou presença de própolis, sendo um grupo infectado e tratado, um grupo infectado e não tratado e um grupo não infectado e não tratado (controle). Para avaliação da migração celular horizontal, foram capturadas imagens no tempo zero ($t = 0\text{h}$) e com 24 h ($t = \Delta\text{h}$). Imagens foram capturadas por microscópio invertido de fluorescência e contraste de fase e analisadas no programa de processamento de imagens Image J. A migração horizontal foi expressa como a porcentagem de fechamento da ferida (risco): % de migração horizontal = $[(A_{t=0\text{h}} - A_{t=\Delta\text{h}}) / A_{t=0\text{h}}] \times 100\%$. Onde, $A_{t=0\text{h}}$ é a área do risco mensurada no tempo zero e $A_{t=\Delta\text{h}}$ é área do risco no tempo avaliado (24 h) (COTA TEIXEIRA, et al., 2019; LIANG, et al., 2007). Três experimentos independentes em nove réplicas foram realizados.

4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados como média e desvio padrão usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA*) pelo teste One-Way ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Tratamentos com altas concentrações das própolis marrom, verde e vermelha alteraram a viabilidade de células HTR-8/SVneo

Para avaliar o impacto dos tratamentos na viabilidade celular, células trofoblásticas extravilosas humanas (linhagem HTR-8/SVneo) foram tratadas com própolis marrom, verde e vermelha (Fig. 1). Células HTR-8/SVneo expostas à própolis em diferentes concentrações apresentaram perda de viabilidade 24 h após o tratamento quando em altas doses. A dose mínima para efeito tóxico, medida pela perda de viabilidade, foi de 128 $\mu\text{g/mL}$ para própolis marrom (** $P = 0,0001$; Fig. 1A) e própolis verde (** $P = 0,0001$; Fig. 1B), e 64 $\mu\text{g/mL}$ para própolis vermelha (** $P = 0,0001$; Fig. 1C). Todos os grupos tratados foram comparados com células incubadas apenas com meio de cultura (grupo controle). Como controle do veículo utilizado para diluir as amostras, as células HTR-8/SVneo tratadas com DMSO 0,8%, 0,4% e 0,2% (correspondente às concentrações de 512, 256 e 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e não apresentaram perda de viabilidade celular.

Figura 1

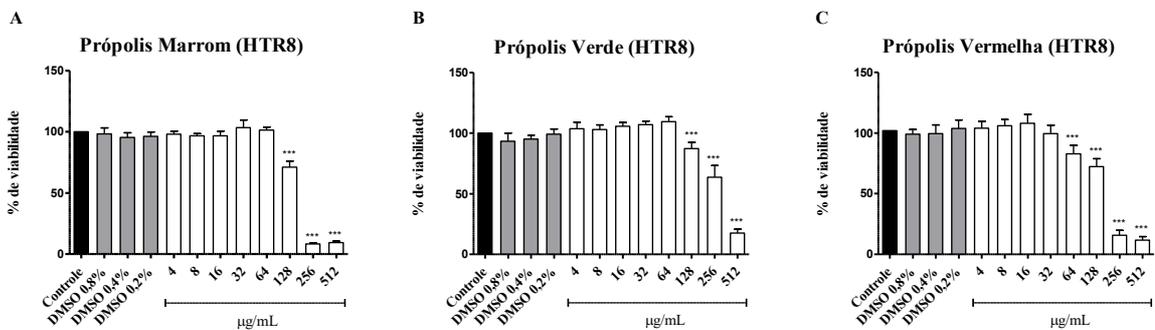


Figura 1. Viabilidade da célula hospedeira pelo ensaio MTT. As células HTR-8/SVneo foram tratadas por 24 h em diluições seriadas 1:2 (variando de 4 a 512 $\mu\text{g/mL}$) com própolis (A) Marrom, (B) Verde, (C) Vermelha. As células HTR-8/SVneo foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle) e DMSO a 0,2%, 0,4% e 0,8% (solvente das própolis na menor, maior e concentração média). A viabilidade celular foi expressa em porcentagens (% de viabilidade celular), sendo a absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura considerada como 100% de viabilidade. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em oito réplicas. Diferenças significativas na análise da variância detectadas pelo teste de One-Way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5.2 Os extratos bruto das própolis reduziram significativamente a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo

No ensaio de viabilidade celular por MTT, estabelecemos concentrações de cada extrato bruto da própolis que não diminuam a viabilidade das células HTR-8/SVneo para posteriores experimentos. Para o ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii*, foram utilizadas diluições não tóxicas de própolis marrom, verde (variando de 4 a 64 µg/mL) e vermelha (variando de 4 a 32 µg/mL). Todas as própolis testadas inibiram a proliferação do parasito, sendo: própolis marrom e verde (4, 8, 16, 32, e 64 µg/mL; *** P < 0,0001) (Figs. 2A, B), e própolis vermelha (4, 8, 16 e 32 µg/mL; *** P < 0,0001) (Fig. 2C) quando comparado com células HTR-8/SVneo não tratadas e infectadas (grupo controle). O tratamento clássico com sulfadiazina e pirimetamina (100 e 4 µg/mL, respectivamente; *** P < 0,0001) também inibiu a proliferação do parasito.

Figura 2

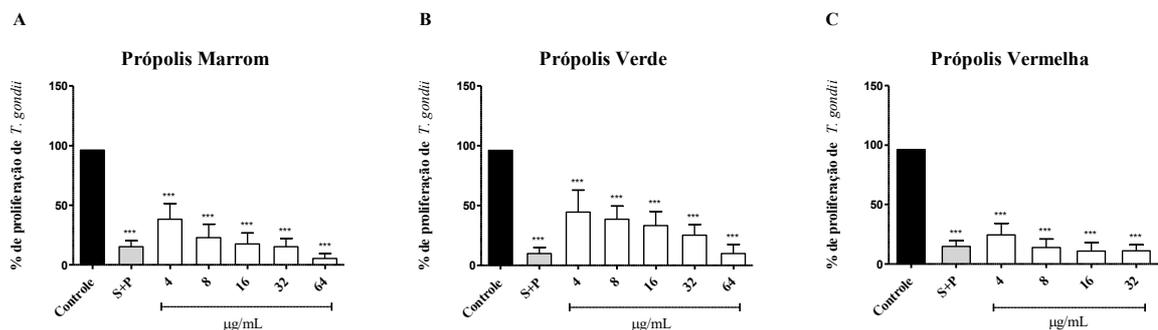


Figura 2. Triagem baseada em atividade de β -galactosidase. Células HTR-8/SVneo infectadas com *T. gondii* foram tratadas por 24 h com concentrações não tóxicas em diluições seriadas 1:2 de própolis de (A) Marrom (variando de 4 a 64 µg/mL), (B) Verde (variando de 4 a 64 µg/mL), (C) Vermelha (variando de 4 a 32 µg/mL). As células HTR-8/SVneo foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle considerado como 100% de proliferação parasitária), e uma combinação de 100 µg/mL de sulfadiazina e 4 µg/mL de pirimetamina (S + P). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase e expressa em porcentagem de mudança em relação ao controle (% de proliferação de *T. gondii*). Nossos resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em oito réplicas. * Comparação entre células infectadas/não tratadas e células infectadas/tratadas. Foi utilizado One-Way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para avaliar diferenças significativas (P < 0,05).

5.3 As própolis exibiram uma ação antiparasitária parcialmente irreversível dependente da concentração

Para determinar se os efeitos antiparasitários promovidos pelas própolis eram reversíveis, células HTR-8/SVneo infectadas foram tratadas por 24 h com as três própolis, na menor e maior concentração não tóxica; lavadas as monocamadas de células e, em seguida, incubadas as células no meio livre de tratamento por mais 24 h. De acordo com nossos resultados anteriores da triagem baseada em atividade de β -galactosidase, todas as própolis marrom e verde testadas nas concentrações entre 4 e 64 $\mu\text{g/mL}$ e própolis vermelha entre 4 e 32 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de controlar a proliferação do parasita após 24 h de tratamento, em comparação com o grupo não tratado (controle) (Figs. 3A, B, C). Curiosamente, os tratamentos com própolis marrom (4 e 64 $\mu\text{g/mL}$: *** $P < 0,0001$; Fig. 3A), própolis verde (64 $\mu\text{g/mL}$: *** $P < 0,0007$; Fig. 3B), própolis vermelha (4 e 32 $\mu\text{g/mL}$: *** $P < 0,0036$ e *** $P < 0,0003$, respectivamente; Fig. 3C), e tratamento com a associação S + P (*** $P < 0,0001$; Fig. 4) reduziram a taxa de proliferação parasitária mesmo após 24 h de remoção do tratamento em contraste com o grupo não tratado. Vale ressaltar que o tratamento com 64 $\mu\text{g/mL}$ de própolis marrom (& $P < 0,0374$; Fig. 4A) foi mais eficiente na inibição do crescimento do parasito em comparação com o tratamento clássico de S + P. Além disso, a concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ de própolis marrom (\$\$\$ $P < 0,0001$; Fig. 3A) e verde (\$ $P < 0,0109$; Fig. 3B) demonstrou ser mais eficiente que a concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ no controle do parasitismo, mesmo 24 h após a remoção do tratamento. Apenas o tratamento com própolis verde na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,1016$; Fig. 3B) tendeu a ser reversível após 24 h. Esses resultados sugerem que as própolis, assim como a combinação de sulfadiazina + pirimetamina, mantiveram seu efeito antiproliferativo, mesmo com a remoção do tratamento (Fig. 3).

Figura 3

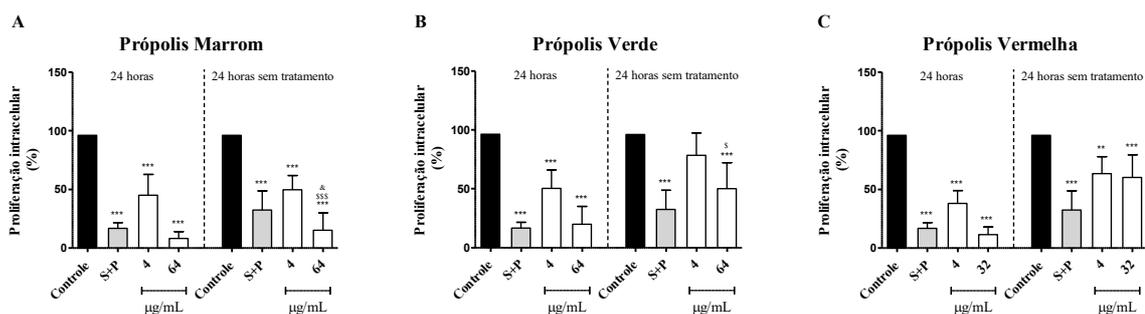


Figura 3. Avaliação da manutenção dos efeitos antiparasitários de própolis por ensaio de reversibilidade. Células HTR-8/SVneo infectadas com *T. gondii* foram expostas 4 e 64 µg/mL de própolis marrom (A) e verde (B), 4 e 32 µg/mL de própolis vermelha (C) e S + P (100 + 4 µg/mL) e meio de cultura, por 24 h, seguido de remoção do tratamento por mais 24 h. A proliferação parasitária em 24 h de tratamento com própolis foi considerada para comparação. A taxa de reversibilidade mede a capacidade dos parasitos de se recuperarem do tratamento e recuperar a infecciosidade. A relação é apresentada em variação percentual (% de reversibilidade do tratamento) em comparação com o grupo controle, que foi considerado como 100% de reversibilidade. O ensaio de β-galactosidase foi utilizado como indicador da atividade parasitária. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes em oito réplicas. * Comparação entre células infectadas/não tratadas e células infectadas/tratadas; & Comparação entre tratamento com própolis e S + P; \$ Comparação entre as diferentes concentrações da mesma própolis. Diferenças significativas foram analisadas utilizando One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5.4 Pré-tratamento de taquizoítos do *T. gondii* com própolis prejudica a invasão a células HTR-8/SVneo

Para avaliar se os tratamentos com própolis têm como alvo a célula hospedeira ou o parasito avaliamos se os tratamentos com própolis afetariam a invasão de parasitos. Foi observado que não houve diferença significativa da invasão de *T. gondii* quando as células foram pré-tratadas com diferentes própolis ou S+P (Fig. 4A). Além disso, os taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados, por 1 h, com diferentes própolis e depois incubados com células HTR-8/SVneo por 3h previamente aderidas. Com relação à invasão parasitária, nossos dados sugerem que o pré-tratamento dos taquizoítos de *T. gondii* por uma hora com 64 µg/mL de própolis marrom (* $P < 0,0208$; Fig. 4B) e verde (***) $P < 0,0003$; Fig. 4B), e com própolis vermelha (4 e 32 µg/mL: *** $P < 0,0005$, *** $P < 0,0002$, respectivamente; Fig. 4B) reduziram significativamente a invasão do parasita (3 h) em comparação com o grupo controle. O pré-tratamento do parasito com S+P também diminuiu a invasão do parasita quando comparado com os parasitos incubados apenas com meio de cultura (grupo controle) (***) $P < 0,0009$; Fig. 4B).

Figura 4

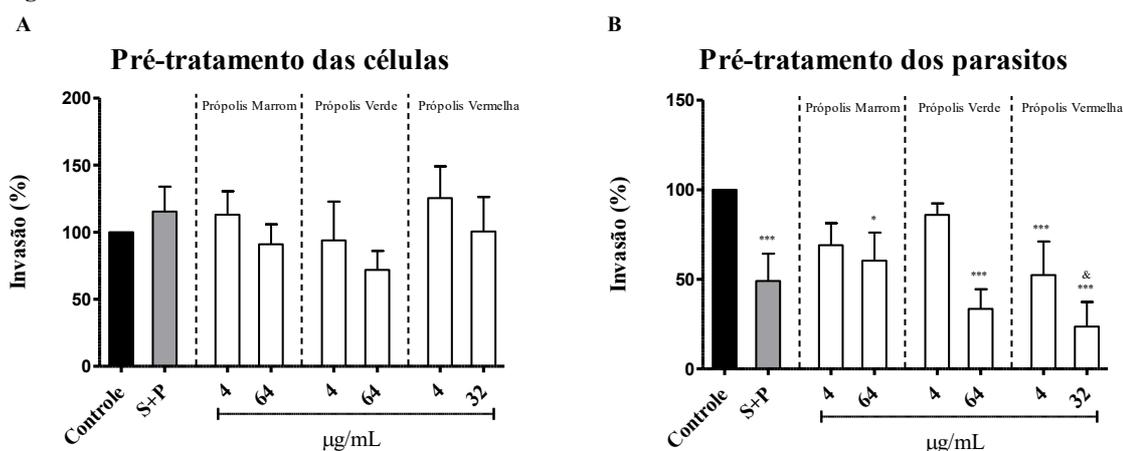


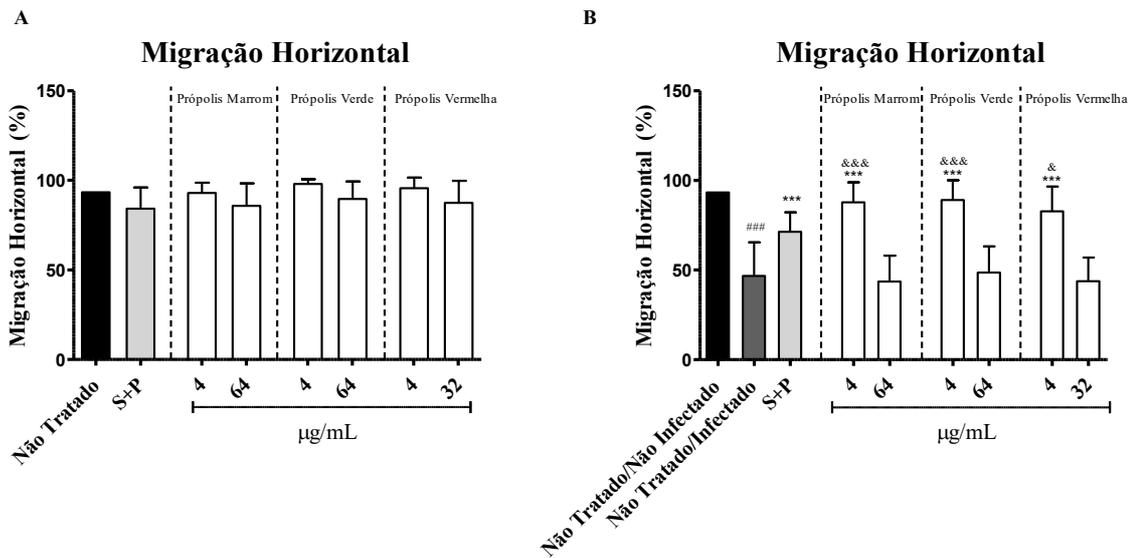
Figura 4. Invasão de taquizoítos de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo. Células HTR-8/SVneo foram pré-tratadas por 24 h com 4 e 64 µg/mL de própolis marrom e verde, 4 e 32 µg/mL de própolis vermelha e S + P (100 + 4 µg/mL) e meio de cultura (grupo controle/grupo não tratado) e, posteriormente, infectadas (A). Os taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 h com 4 e 64 µg/mL de própolis marrom e verde, 4 e 32 µg/mL de própolis vermelha e S + P (100 + 4 µg/mL) e meio de cultura e, em seguida, incubados com células aderidas (B). Em ambas situações a invasão foi avaliada após 3 h pelo ensaio de β-galactosidase. Para as células não tratadas (A) e parasitos não tratados (B), o número de parasitos invadidos foi considerado como 100%. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes em oito réplicas. * Comparação entre parasitos não tratados e parasitos tratados; & Comparação entre tratamento com própolis e S + P; Diferenças significativas foram analisadas utilizando One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5.5 Baixas concentrações de própolis recuperaram a capacidade de migração horizontal de células HTR-8/SVneo infectadas

Uma vez que a linhagem de células HTR-8/SVneo apresenta propriedades migratórias, o ensaio de cicatrização de feridas (*wound healing*) foi realizado para avaliar o impacto da infecção e dos tratamentos com a própolis na migração celular. Para este ensaio, células HTR-8/SVneo foram infectadas ou não por 3 h com taquizoítos de *T. gondii* e, posteriormente, foi realizado o risco sobre a monocamada de células. Em seguida, as células foram cultivadas na ausência ou presença de própolis por 24h. Nossos dados demonstram que as células HTR-8/SVneo não infectadas, quando submetidas ao tratamento com as diferentes concentrações de própolis e associação de S+P, não perderam a capacidade de migrar horizontalmente (Fig. 5A). Por outro lado, a infecção com taquizoítos de *T. gondii* levou à uma redução significativa da capacidade de migração das células HTR-8/Svneo (### $P < 0,0001$; Fig. 5B) em comparação com o controle não infectado e não tratado. Interessantemente, os tratamentos na concentração de 4 µg/mL com própolis marrom, verde e vermelha levaram à uma recuperação da migração das células HTR-8/SVneo quando

infectadas, em comparação com o grupo infectado e não tratado (***) $P < 0,0001$; Figs. 5A, B). Além disso, as própolis marrom (&&& $P < 0,0005$; Figs. 5B), verde (&&& $P < 0,0004$; Figs. 5B) e vermelha (& $P < 0,0234$; Figs. 5B) na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ conseguiram reverter ainda mais capacidade de migração das células quando comparadas ao tratamento com S+P. Imagens representativas que destacam a migração celular são apresentadas de acordo com as condições analisadas (Fig. 5C).

Figura 5



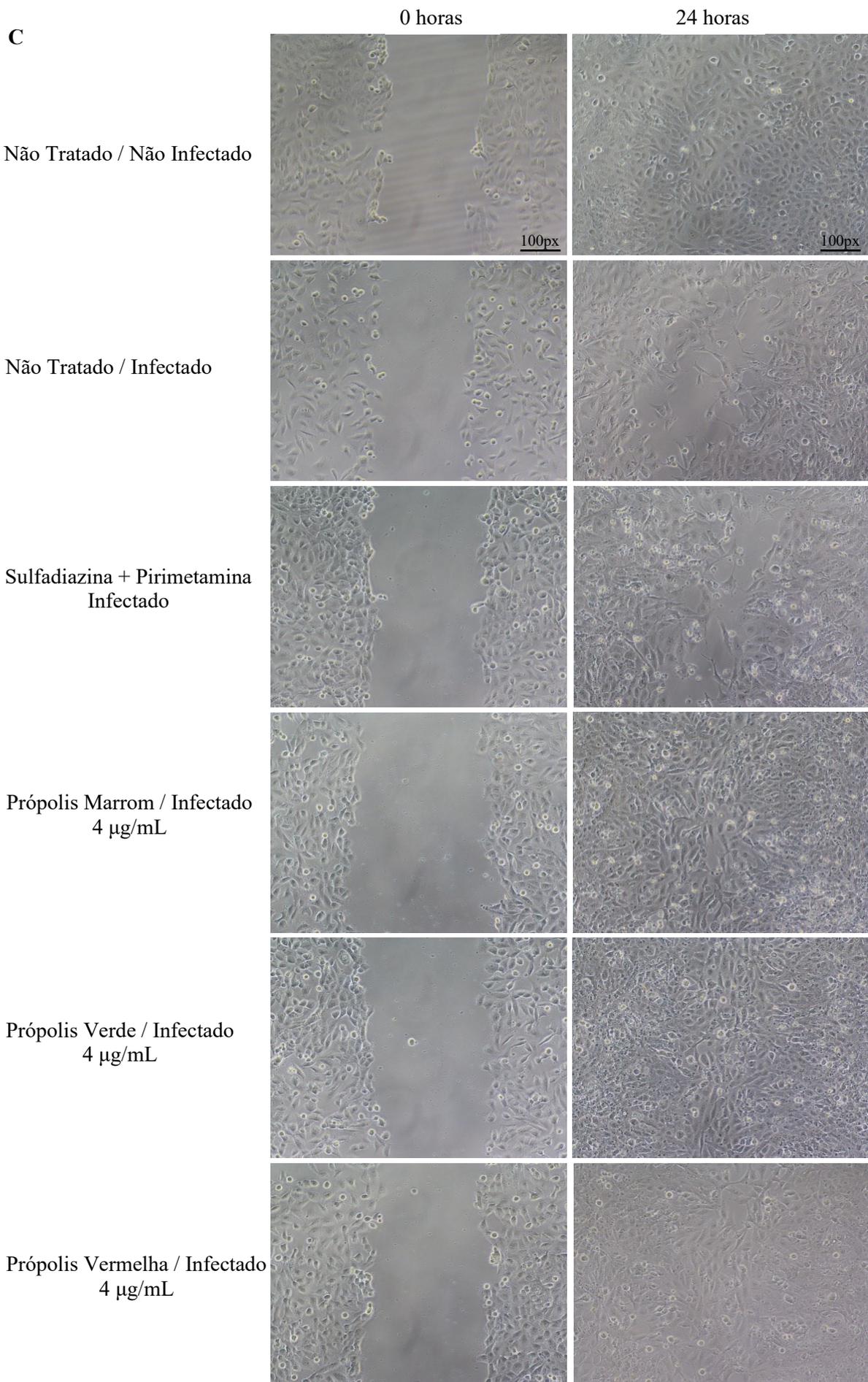


Figura 5. Ensaio de cicatrização de feridas. Células HTR-8/SVneo foram tratadas com 4 e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de própolis marrom e verde, 4 e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de própolis vermelha e S + P (100 + 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e meio de cultura por 24 h (A), simultaneamente, em outra placa as células foram infectadas antes de ser realizado o risco (B). As imagens foram obtidas nos períodos de 0 e 24 h (C). A migração é apresentada em percentual (% de migração das células) em comparação com o grupo controle (não tratado e não infectado), que foi considerado como 100% de migração. Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em nove réplicas. # Comparação entre não tratado/não infectado e não tratado/infectado; * Comparação entre células infectadas/não tratadas e células infectadas/tratadas; & Comparação entre tratamento com própolis e S + P. Diferenças significativas foram analisadas utilizando One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma doença disseminada mundialmente em populações humanas e animais, e é responsável por vários impactos negativos na saúde humana. *T. gondii* pode ser transmitido verticalmente da mãe para o feto, causando a toxoplasmose congênita, podendo levar a abortos espontâneos, natimortos e outros desfechos adversos, dependendo do estágio da gestação em que a infecção ocorre (PFAFF et al., 2007). O tratamento padrão para infecções por *T. gondii* é a combinação de pirimetamina com sulfadiazina ou clindamicina (ZHAO, EWALD, 2020). Para as gestantes, o tratamento consiste na administração de espiramicina até o parto, entretanto, caso ocorra a detecção do DNA de *T. gondii* no líquido amniótico é recomendado a substituição pela pirimetamina e sulfadiazina, pois estão associadas ao melhor desfecho clínico (MANDELBROT et al., 2018; GUEGAN et al., 2021). No entanto, esse tratamento é mal tolerado devido à sua toxicidade que causa efeitos colaterais, principalmente, por ser comum a hipersensibilidade às sulfonamidas (SHAMMAA et al., 2021). Por isso, há uma fragilidade no tratamento padrão atual, pois a sua toxicidade pode fazer com que o tratamento seja descontinuado ou, mais frequentemente, induza uma baixa adesão (KONSTANTINOVIC et al., 2019). O controle da proliferação de *T. gondii* na interface materno-fetal tem se mostrado crucial para o sucesso da gravidez. Nesse contexto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos do extrato bruto de três própolis brasileiras em células trofoblásticas humanas extravilosas, em *T. gondii* e no contexto da infecção, em busca por alternativas terapêuticas não tóxicas para o tratamento da toxoplasmose congênita.

Nossos resultados indicam que os tratamentos com as própolis, em concentrações não tóxicas, são capazes de inibir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo. Estudos prévios demonstraram que própolis de diferentes fontes botânicas foram capazes de controlar a proliferação de outros parasitos relevantes do ponto de vista da parasitologia humana, incluindo o *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Trichomonas* spp., *Giardia* spp. (DE L PAULA et al., 2021). Esse estudo é o primeiro a avaliar o potencial anti-*T. gondii* das própolis brasileiras marrom, verde e vermelha usando modelo *in vitro* de células da interface materno-fetal (HTR-8/SVneo). Esses resultados juntamente com o que tem sido demonstrado na literatura deixam claro o potencial terapêutico e antiparasitário da própolis.

Após verificarmos que as própolis diminuem o parasitismo, buscamos determinar se o efeito da própolis ocorre na célula, no parasito, ou em ambos. Com relação a célula do

hospedeiro a própolis atua como um imunomodulador, aumentando a imunidade inata e diminuindo respostas pró-inflamatórias (MACHADO et al., 2012); notamos que a própolis atuou diretamente em *T. gondii* prejudicando a invasão à célula, sugerindo que a própolis inibe enzimas e proteínas necessárias para a invasão às células do hospedeiro, além disso, a própolis inibe o processo de replicação ao impedir a síntese de enzimas necessárias para a replicação dos materiais genéticos, o que dificulta a manutenção dos processos metabólicos por interromper organelas celulares e componentes responsáveis pela produção de energia (ZULHENDRI et al., 2021), entretanto são necessários estudos adicionais para o entendimento dos mecanismos intracelulares envolvidos que levam ao controle parasitário em células trofoblásticas infectadas por *T. gondii* e tratadas com as própolis.

Nossos resultados indicam que a ação antiparasitária das própolis é dose dependente e, que este efeito pode ser reversível ou irreversível, em dependência da dose utilizada. Os mecanismos intracelulares envolvidos nestes efeitos são desconhecidos e novos estudos se fazem necessários para a compreensão efetiva do fenômeno.

A placenta é o órgão altamente especializado da gravidez que permite o crescimento e desenvolvimento normal do feto. Os trofoblastos são o principal tipo celular da placenta e podem se diferenciar de citotrofoblasto viloso para sinciciotrofoblasto ou trofoblasto extraviloso (SHERIDAN et al., 2021). O sinciciotrofoblasto é uma camada de células multinucleadas que reveste a superfície mais externa das vilosidades da placenta humana onde ocorre a troca de nutrientes entre a mãe e o feto, essa camada atua como barreira eficaz contra a invasão de patógenos intracelulares (ROBBINS et al., 2012; HUPPERTZ; GAUSTER, 2011). O processo fisiológico de migração e invasão à decídua materna pelo trofoblasto extraviloso é responsável pelo remodelamento das arteríolas espiraladas, o que garante o adequado suprimento sanguíneo materno no espaço interviloso para o crescimento e desenvolvimento fetal normal (CHANG et al., 2018). As células trofoblásticas extravilosas apresentam maior susceptibilidade a infecção por *T. gondii* quando comparadas às células sinciciotrofoblásticas e citotrofoblásticas, a alta susceptibilidade pode impedir ou resultar em uma invasão inadequada à decídua materna, que está associada a síndromes obstétricas, que incluem pré-eclâmpsia, restrição de crescimento fetal e natimorto (ABBAS et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021). Por esse motivo, realizamos o ensaio de migração a fim de investigar os efeitos da infecção e dos tratamentos na migração do trofoblasto extraviloso. Nossos achados demonstram que a infecção de células HTR-8/Svneo por *T.gondii* é capaz de reduzir a migração do trofoblasto extraviloso, sugerindo que a infecção pode estar relacionada com o não remodelamento das arteríolas espiraladas e o

comprometimento do sucesso gestacional. Nesse contexto, as própolis demonstraram ser capazes de recuperarem a migração horizontal de células HTR-8/SVneo infectadas em baixas concentrações. Estudos prévios evidenciaram que baixas concentrações de própolis promovem a migração e invasão de células estromais da medula óssea (ELKHENANY et al., 2019), em contrapartida, altas concentrações as própolis estão associadas à inibição da migração e invasão de células tumorais como MDA-MB-231 e U937 (ASO et al., 2004; LI et al., 2021).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que as própolis marrom, verde e vermelha nas concentrações de 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL, 4, 8, 16, 32 µg/mL, respectivamente, não são tóxicas para o trofoblasto humano extraviloso e provocam um efeito inibitório na proliferação intracelular de forma dose dependente. As própolis marrom e verde na concentração de 64 µg/mL, e vermelha na concentração de 32 µg/mL prejudicaram a invasão de taquizoítos de *T. gondii*, quando foram pré-tratados. Além disso, nenhuma própolis alterou a capacidade de migração das células HTR-8/SVneo, entretanto, as própolis marrom, verde e vermelha na concentração de 4 µg/mL foram capazes de promover a recuperação da migração das células infectadas. Dessa forma, esses resultados reforçam a importância de compreender mais as interações entre a própolis, *T. gondii* e células da interface materno-fetal, pois a toxoplasmose congênita é uma doença de alta incidência global que possui uma pluralidade de manifestações clínicas que afetam as gestantes, o feto e crianças. Além disso, os fármacos atualmente utilizados são tóxicos, causam efeitos colaterais e não são capazes de eliminar completamente a infecção. Portanto, faz-se necessário a descoberta de novas terapias com baixa toxicidade que sejam capazes de reduzir a transmissão vertical e que, ao mesmo tempo, não prejudiquem etapas essenciais do processo gestacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Y.; TURCO, M.Y.; BURTON, G.J.; MOFFETT, A. Investigation of human trophoblast invasion in vitro. **Human reproduction update**, v. 26, n. 4, p. 501–513, 2020.
- AFROUZAN, H.; ZAKERI, S.; ABOUIE MEHRIZI, A.; MOLASALEHI, S.; TAHGHIGHI, A.; SHOKRGOZAR, M.A.; ES-HAGHI, A.; DINPARAST DJADID, N. Anti-Plasmodial Assessment of Four Different Iranian Propolis Extracts. **Archives of Iranian medicine**, v. 20, n. 5, p. 270–281, 2017.
- ALBRECHT, E.D.; PEPE, G.J. Regulation of Uterine Spiral Artery Remodeling: a Review. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 27, n. 10, p. 1932–1942, 2020.
- ARRANZ-SOLÍS, D.; MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J. Toxoplasma Effectors that Affect Pregnancy Outcome. **Trends in parasitology**. v. 37, n. 4, p. 283–295, 2021.
- ASO, K.; KANNO, S.; TADANO, T.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 5, p. 727–730, 2004.
- ASPÖCK H. Prevention of congenital toxoplasmosis in Austria: experience of 25 years. Congenital toxoplasmosis. **New York: Springer**, p. 277–292, 2000.
- BARBOSA, B.F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; MINEO, T.W.P.; FERRO, E.A.V. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152–162, 2014.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology.**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.
- CHAMLEY, L.W.; HOLLAND. O.J.; CHEN. Q.; VIAL. C.A.; STONE. P.R.; ABUMAREE. M. Review: where is the materno interface? **Placenta**, v. 35, suppl. S74- 80, 2014.

CHANG, C.W.; WAKELAND, A.K.; PARAST, M.M. Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. **The Journal of endocrinology**, v. 236, n. 1, p. R43–R56, 2018.

CHEN, Y.W.; YE, S.R.; TING, C.; YU, Y.H. Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. **J Food Drug Anal.**, v.26, p. 761– 768, 2018.

COSTA, I.N.; RIBEIRO, M.; SILVA FRANCO, P.; DA SILVA, R.J.; DE ARAÚJO, T.E.; MILIÁN, I.; LUZ, L. C.; GUIRELLI, P.M.; NAKAZATO, G.; MINEO, J.R.; MINEO, T.; BARBOSA, B.F.; FERRO, E. Biogenic Silver Nanoparticles Can Control *Toxoplasma gondii* Infection in Both Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 623947, 2021.

COTA TEIXEIRA, S.; SILVA LOPES, D.; SANTOS DA SILVA, M.; CORDERO DA LUZ, F.A.; CIRILO GIMENES, S.N.; BORGES, B.C.; ALVES DA SILVA, A.; ALVES MARTINS, F.; ALVES DOS SANTOS, M.; TEIXEIRA, T.L.; OLIVEIRA, R.A.; DE MELO RODRIGUES ÁVILA, V.; BARBOSA SILVA, M.J.; ELIAS, M.C.; MARTIN, R.; VIEIRA DA SILVA, C.; KNÖLKER, H.J. Pentachloropseudilin Impairs Angiogenesis by Disrupting the Actin Cytoskeleton, Integrin Trafficking and the Cell Cycle. **ChemBiochem**, v. 20, n. 18, p. 2390-2401, 2019.

COYNE, C.B.; LAZEAR, H.M. Zika virus - reigniting the TORCH. **Nature reviews. Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 707–715, 2016.

CUERVO, G.; SIMONETTI A.F.; ALEGRE, O.; SANCHEZ-SALADO, J.C.; PODZAMCZER, D. *Toxoplasma myocarditis*: a rare but serious complication in an HIV-infected late presenter. **AIDS**, v. 30, n. 14, p. 2253-2254, 2016.

DA SILVA, R.J.; GOMES, A.O.; FRANCO, P.S.; PEREIRA, A.S.; MILIAN, I.C. B.; RIBEIRO, M.; FIORENZANI, P.; DOS SANTOS, M.C.; MINEO, J.R.; DA SILVA, N.M.; FERRO, E.A.V.; DE FREITAS, B. Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from Human Third Trimester Pregnancy. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 7, n.340, p. 1-21, 2017.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 5, p. 435-441, 2008.

DE L PAULA, L.A.; CÂNDIDO, A.; SANTOS, M.; CAFFREY, C.R.; BASTOS, J.K.; AMBRÓSIO, S.R.; MAGALHÃES, L.G. Antiparasitic Properties of Propolis Extracts and Their Compounds. **Chemistry & biodiversity**, v. 18, n. 9, e2100310, 2021.

DE MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; DO NASCIMENTO, T.G.; DE SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; MOUSINHO, K.C.; DOS SANTOS, A.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, v. 15, n. 357, 2015.

DE OLIVEIRA-DEMBOGURSKI, D.S.O.; SILVA TRENTIN, D.; BOARETTO, A.G.; RIGO, G.V.; DA SILVA, R.C.; TASCIA, T.; MACEDO, A.J.; CAROLLO, C.A.; SILVA, D.B. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. **Food Res Int.**, v. 111, p. 661-673, 2018.

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

ELKHENANY, H.; EL-BADRI, N.; DHAR, M. Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 115, 108861, 2019.

ELSALAM, S.A.; MANSOR, A.E.; SARHAN, M.H.; SHALABY, A.M.; GOBRAN, M.A.; ALABIAD, M.A. Evaluation of Apoptosis, Proliferation, and Adhesion Molecule Expression in Trophoblastic Tissue of Women With Recurrent Spontaneous Abortion and Infected With *Toxoplasma gondii*. **International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists**, 40(2), 124–133 2021.

FALLAHI, S.; ROSTAMI, A.; NOUROLLAHPUR-SHIADEH, M.; BEHNIAFAR, H.; PAKTINAT, S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **J Gynecol Obstet Hum Reprod.**, v. 47, p. 133–140, 2018.

FARAH, O.; NGUYEN, C.; TEKKATTE, C.; PARAST, M.M. Trophoblast lineage specific differentiation and associated alterations in preeclampsia and fetal growth restriction, **Placenta**, v. 102, p. 4-9, 2020.

FERREIRA, J.M.; FERNANDES-SILVA, C.C.; SALANTINO, A.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **J Sci Food Agric.**, v. 97, p. 3552–3558, 2017.

FITZGERALD, J. S.; POEHLMANN, T. G.; SCHLEUSSNER, E.; MARKERT, U. R. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signaling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3). **Hum Reprod Update.**, v. 14, n. 4, p. 335-344, 2008.

FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry.**, v. 110, p. 267–279, 2016.

GATHIRAM. P., MOODLEY. J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 27, n. 2, p. 71-78, 2016.

GOMES, M.F.F.; ÍTAVO, C.C.B.F.; LEAL, C.R.B.; ÍTAVO, L.C.V.; LUNAS, R.C. Atividade antibacteriana in vitro da propolis marrom. **Pesqui Vet Bras.**, v. 36, p. 279- 282, 2016.

GÓMEZ-CHÁVEZ, F.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; FLORES-GARCÍA, Y.; FIGUEROA-DAMIÁN, R.; LUNA-PASTÉN, H.; GÓMEZ-TOSCANO, V.; LÓPEZ-CANDIANI, C.; ARCE-ESTRADA, G.E.; BONILLA-RÍOS, C.A.; MORA-GONZÁLEZ, J.C.; GARCÍA-RUIZ, R.; CORREA, D.A. Proinflammatory Immune Response Might Determine *Toxoplasma gondii* Vertical Transmission and Severity of Clinical Features in Congenitally Infected Newborns. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 390, 2020.

GUEGAN, H.; STAJNER, T.; BOBIC, B.; PRESS, C.; OLARIU, R.T.; OLSON, K.; SRBLJANOVIC, J.; MONTOYA, J.G.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; ROBERT-GANGNEUX, F. Maternal Anti-Toxoplasma Treatment during Pregnancy Is Associated with Reduced Sensitivity of Diagnostic Tests for Congenital Infection in the Neonate. **J Clin Microbiol.** v. 59, n. 2, p. e01368-20, 2021.

HIDE, G. Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection. **Expert Rev. Anti. Ther.**, v.14, p. 335–344. 2016.

HRNCIR, M.; JARAU, S.; BARTH, F.G. Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. **J Comp Physiol.**, v. 202, p. 597–601, 2016.

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

JUSTUS, C.R.; LEFFLER, N.; RUIZ-ECHEVARRIA, M.; YANG, L.V. In vitro cell migration and invasion assays. **J Vis Exp.**, v. 88, p. 51046, 2014.

KELLAM, P.; WEISS, R.A. Protecting fetal development. **Science (New York, N.Y.)**, v. 365, n. 6449, p. 118–119, 2019.

KINGDOM, J.C.; AUDETTE, M.C.; HOBSON, S.R.; WINDRIM, R.C.; MORGEN, E. A placenta clinic approach to the diagnosis and management of fetal growth restriction. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 218, n. 2S, p. S803–S817, 2018.

KONSTANTINOVIC, N.; GUEGAN, H.; STAJNER, T.; BELAZ, S.; ROBERT-GANGNEUX, F. Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives. **Food Waterborne Parasitol.** v. 1, n. 15, 2019.

LANG, C.; GROSS, U.; LÜDER, G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res.**, v. 100, p. 191-203, 2007.

LI, Y.; YAN, J.; CHANG, H.M.; CHEN, Z.J.; LEUNG, P. Roles of TGF- β Superfamily Proteins in Extravillous Trophoblast Invasion. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 32, n. 3, p. 170–189, 2021.

LI, J.; LIU, H.; LIU, X.; HAO, S.; ZHANG, Z.; XUAN, H. Chinese Poplar Propolis Inhibits MDA-MB-231 Cell Proliferation in an Inflammatory Microenvironment by Targeting Enzymes of the Glycolytic Pathway. **Journal of immunology research**, v. 2021, 6641341, 2021.

LIANG, C.C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.

LYALL.F., ROBSON. S. C., BULMER. J. N. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. **Hypertension**, v. 62, n. 6, p. 1046-1054, 2013.

MACHADO, J.L.; ASSUNÇÃO, A.K.M.; SILVA, M.C.P.; REIS, A.S.; COSTA, G.C.; ARRUDA, D.S.; ROCHA, B.A.; VAZ, M.M.O.L.L.; PAES, A.M.A.; GUERRA, R.N.M.; BERRETTA, A.A.; DO NASCIMENTO, F.R.F. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, 157652, 2012.

MANDELBROT, L.; KIEFFER, F.; SITTA, R.; LAURICHESSE-DELMAS, H.; WINER, N.; MESNARD, L.; BERREBI, A.; LE BOUAR, G.; BORY, J.P.; CORDIER, A.G.; VILLE, Y.; PERROTIN, F.; JOUANNIC, J.M.; BIQUARD, F.; D'ERCOLE, C.; HOUFFLIN-DEBARGE, V.; VILLENA, I.; THIÉBAUT, R.; TOXOGEST Study Group. Prenatal therapy with pyrimethamine + sulfadiazine vs spiramycin to reduce placental transmission of toxoplasmosis: a multicenter, randomized trial. **Am J Obstet Gynecol.** v. 219, n. 4, p. 386, 2018.

MARTINS-DUARTE, E.S.; DUBAR, F.; LAWTON, P.; DA SILVA, C.F.; SOEIRO MDE, N.; DE SOUZA, W.; BIOT C.; VOMMARO, R.C. Ciprofloxacin Derivatives Affect Parasite Cell Division and Increase the Survival of Mice Infected with *Toxoplasma gondii*. **PLoS One.**, v. 10, n. 5, e0125705, 2015.

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.

MENECEUR, P.; BOULDOUYRE, M. A.; AUBERT, D.; VILLENA, I.; MENOTTI, J.; SAUVAGE, V.; GARIN, J. F.; DEROUIN, F. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1269–1277, 2008.

MERCER, H.L.; SNYDER, L.M.; DOHERTY, C.M.; FOX, B.A.; BZIK, D.J.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA24 drives MyD88-independent p38 MAPK activation, IL-12 production and induction of protective immunity. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 5, e1008572, 2020.

MONTAZERI, M.; MEHRZADI, S.; SHARIF, M.; SARVI, S.; TANZIFI, A.; AGHAYAN, S.A.; DARYANI, A. Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2587, 2018.

MONTOYA J.G.; REMINGTON J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis.**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet.**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHOPADHYAY, D.; ARRANZ-SOLÍS, D.; SAEIJ, J. Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During *Toxoplasma* Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, 580425, 2020.

OZ H.S. Novel Synergistic Protective Efficacy of Atovaquone and Diclazuril on Fetal-Maternal Toxoplasmosis. **Int J Clin Med.**, v. 5, n. 15, p. 921-932, 2014.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 2002.

PÉREZ BRANDÁN, C.; MESIAS, A.C.; ACUÑA, L.; TEIXEIRA, T.L.; DA SILVA,

C.V. Evaluation of pathogen P21 protein as a potential modulator of the protective immunity induced by *Trypanosoma cruzi* attenuated parasites. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 114, p. 1-7, 2019.

PFAFF, A.W.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGAS, A.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. **Parasitology**, v. 134, p. 1895–1902, 2007.

PIETTA P.G.; GARDANA C.; PIETTA A.M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia.**, v. 73, n. 1, p. S7–S20, 2002.

REBOUÇAS-SILVA, J.; CELES, F.S.; LIMA, J.B.; BARUD, H.S.; DE OLIVEIRA, C.I.; BERRETTA, A.A.; BORGES, V.M. Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by Standardized Propolis Extracts. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2017, 6067172, 2017.

REDMAN. C. W., SARGENT. I. L. Immunology of pre-eclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 534-543, 2010.

ROBBINS, J.R.; ZELDOVICH, V.B.; POUKCHANSKI, A.; BOOTHROYD, J.C.; BAKARDJIEV, A.I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and immunity**, v. 80, n. 1, p. 418–428, 2012.

RODRIGUES, D.M.; DE SOUZA, M.C.; ARRUDA, C.; PEREIRA, R.A.S.; BASTOS, J.K. The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **J Chem Ecol.**, v. 46, n. 2, p. 150-162, 2020.

RUFATTO, L.C.; SANTOS, D.A.S.; MARINHO, F.; HENRIQUES, J.A.P.; ELY, M.R.; MOURA, S. Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v. 7, p. 591– 598, 2017.

SALOMÃO, K.; DE SOUZA, E.M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2011, 185918, 2011.

SHAMMAA, A.M.; POWELL, T.G.; BENMERZOUGA, I. Adverse outcomes associated with the treatment of *Toxoplasma* infections. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1035, 2021.

SHERIDAN, M.A.; ZHAO, X.; FERNANDO, R.C.; GARDNER, L.; PEREZ-GARCIA, V.; LI, Q.; MARSH, S.G.E.; HAMILTON, R.; MOFFETT, A.; TURCO, M.Y. Characterization of primary models of human trophoblast. **Development**. v. 148, n. 21, p. 199749, 2021.

TEIXEIRA, S.C.; DE SOUZA, G.; BORGES B.C.; DE ARAÚJO, T.E.; ROSINI, A.M.; AGUILA, F.A.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.J.B.; MARTINS, C.H.G.; DE FREITAS BARBOSA, B.; FERRO, E.A.V. Copaifera spp. oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. **Sci Rep.**, v.10, n 1, p.151-58, 2020.

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

TEIXEIRA, T.L.; CASTILHOS, P.; RODRIGUES, C.C.; DA SILVA, A.A.; BRÍGIDO, R.T.; TEIXEIRA, S.C.; BORGES, B.C.; DOS SANTOS, M.A.; MARTINS, F.A.; SANTOS, P.C.F.; SERVATO, J.P.S.; SILVA, M.S.; DA SILVA, M.J.B.; ELIAS, M.C.; DA SILVA, C.V. Experimental evidences that P21 protein controls *Trypanosoma cruzi* replication and modulates the pathogenesis of infection. **Microb Pathog.**, v. 135, p. 1-6, 2019.

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

- TORGERSON, P.R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bull World Health Organ.**, v. 91, p. 501-508, 2013.
- TORRES, D.; HOLLANDS, I.; PALACIOS, E. Effect of an alcoholic extract of propolis on the *in vitro* growth of *Giardia lamblia* 720. **Journal of Veterinary Science.**, v. 21, n.1, p. 15–19, 1990.
- VILLARD, O.; CIMON, B.; L'OLLIVIER, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; GODINEAU, N.; HOUZE, S.; PARIS, L.; PELLOUX, H.; VILLENA, I.; CANDOLFI, E. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 84, p. 22-33, 2016.
- WHARTON, J.; GORDON, L.; BYRNE, J.; HERZOG, H.; SELBIE, L.A.; MOORE, K.; SULLIVAN, M.H.; ELDER, M.G.; MOSCOSO, G.; TAYLOR, K.M.; et al. Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 2, p. 687-691, 1993.
- YUE, P.Y.; LEUNG, E.P.; MAK, N.K.; WONG, R.N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v. 4, p. 427-433, 2010.
- ZHAO, L.; SHAO, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; HE, Y.; WANG, L.; KONG, B.; QU, X. Human monocytes undergo functional re-programming during differentiation to dendritic cell by human extravillous trophoblasts. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 204–209, 2016.
- ZHAO, X.Y.; EWALD, S.E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 7, p. 3370–3380, 2020.
- ZULHENDRI, F.; CHANDRASEKARAN, K.; KOWACZ, M.; RAVALIA, M.; KRIPAL, K.; FEARNLEY, J.; PERERA, C.O. Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 6, p. 1360, 2021.

ANEXOS

ANEXO 1



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

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

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –
Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG – CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;
e-mail: cep@propp.ufu.br ; www.comissoes.propp.ufu.br

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS
COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

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

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

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

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