

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

IZADORA SANTOS DAMASCENO

O TRATAMENTO COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO FRUTO
DE *Punica granatum* L. CONTROLA A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS EXTRA VILOSAS (HTR-8/SVneo)

UBERLÂNDIA

2023

IZADORA SANTOS DAMASCENO

O TRATAMENTO COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO FRUTO
DE *Punica granatum* L. CONTROLA A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS EXTRAVILOSAS (HTR-8/SVneo)

Trabalho de Conclusão de Curso
(TCC II) apresentado ao Instituto de
Biologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para a
conclusão do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas.

Área de Concentração:
Parasitologia Orientadora: Profa. Dra.
Juliana Gonzaga de Oliveira

UBERLÂNDIA

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

IZADORA SANTOS DAMASCENO

O TRATAMENTO COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DO FRUTO
DE *Punica granatum* L. CONTROLA A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS EXTRAHILOSAS (HTR-8/SVneo)

Trabalho de Conclusão de Curso
(TCC II) apresentado ao Instituto de
Biologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para a
conclusão do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Parasitologia
Orientadora: Profª. Dra. Juliana Gonzaga
de Oliveira

Uberlândia, 22 de novembro de 2023.

Banca examinadora

Orientadora: Dra. Juliana Gonzaga de Oliveira, UFU/MG

Membro titular: Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, UFU/MG

Membro titular: Dr. Samuel Cota Teixeira, UFU/MG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em memória do meu amado pai espiritual, amigo fiel e tão amado, Padre Júlio César Siqueira, que deste mundo partiu tão precoce e inesperadamente, e a quem devo muito de quem sou até hoje. A saudade é marca de vida e de amor. Enquanto eu respirar, ele permanecerá vivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

De modo especial, agradeço a Guilherme de Souza, então membro do laboratório onde este trabalho fora realizado. Gui, se este trabalho existe, ele também é seu. Obrigada por ter me acolhido e abraçado comigo a minha pesquisa, pelo apadrinhamento científico desde o começo desta jornada. Obrigada pela sua dedicação e determinação, pela paciência em me ensinar tudo desde o começo, e principalmente por ser um luzeiro em nossos caminhos. Se sei o que sei, devo a você. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

“Eu via sempre o Senhor perto de mim, pois Ele está à minha direita, para que eu não seja abalado. Alegrou-se por isso o meu coração e a minha língua exultou. Sim, também a minha carne repousará na esperança, pois não deixarás a minha alma na região dos mortos, nem permitirás que o teu Santo conheça a corrupção. Fizeste-me conhecer os caminhos da vida, e me encherás de alegria com a visão de tua face.” Atos dos Apóstolos 2, 25-28.

Agradeço, pois, ao Senhor meu Deus, que em tudo fez maravilhas e grande é Seu nome. Ainda que eu oferte minha vida inteira, não seria o bastante para engrandecê-Lo por tudo que Ele fez e faz.

Agradeço aos meus pais, José Henrique e Luciene, os quais roubam de mim as palavras quando ousa agradecer. Pelo amor inesgotável, pelas renúncias que fizeram desde o meu primeiro respirar, pela sabedoria em me conduzir até aqui. Eu os amo profundamente.

Ao meu amor, Patrick, de quem retirei forças quando as minhas se esgotaram, com quem dividi madrugadas de preocupação e quem me trouxe descanso, garantindo que tudo daria certo. E deu certo – talvez porque ele esteve ali. E aos seus pais, Thiago e Valéria, que me abriram as portas de casa para aliviar a rotina do trânsito entre Araguari e Uberlândia, e por me adotarem como filha.

Aos meus poucos e amados amigos, que sabem quem são, e que sempre estiveram ao meu lado para dividir as alegrias e tristezas.

Aos meus familiares que, de perto ou de longe, torceram e oraram por mim.

Ao meu irmão de outro ventre, Fernando Filho, quem sempre cuidou e zelou de mim e da minha casa.

Ao meu querido amigo e pai espiritual, padre Robson de Oliveira, cuja voz de pastor me guiou e iluminou neste caminho.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio e sustento, e por permitir que este grande sonho fosse realizado. Aos professores e colaboradores, os quais foram a base para o meu crescimento.

À minha querida orientadora, professora Juliana Gonzaga de Oliveira, pelo acolhimento desde a primeira aula, pelo amparo e apoio, pelo carinho e compreensão. Admiro muito a senhora e toda a nossa história até aqui.

Em especial, agradeço às professoras Bellisa e Eloisa, pelo espaço e por todo o amparo e oportunidade.

Aos meus amados companheiros de jornada acadêmica na graduação, Samuel e Maria Eduarda. E à Adrielle, minha querida amiga, que sempre esteve ao meu lado desde o primeiro período.

E, por fim, agradeço imensamente aos membros do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, especialmente pelo espírito de união, parceria e disponibilidade em ajudar expressa nos rostos e corações. Pelo apoio, pelos sorrisos, pela alegria sempre compartilhada. Samuel, Alessandra, Joed, Marina, Luana, Vinícius, Guilherme Faria, Clara, Daniel, Rafael e Natália, e tantos outros que passaram por ali.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório causador da toxoplasmose. Para indivíduos imunocompetentes, esta infecção é, geralmente, assintomática. Em gestantes, porém, a toxoplasmose congênita apresenta maior gravidade, e é ocasionada pela passagem de taquizoítos pela barreira placentária, atingindo, então, o feto. Neste contexto, a infecção pode gerar graves sequelas no desenvolvimento embrionário. O tratamento convencional é feito a partir da combinação de dois fármacos, sulfadiazina e pirimetamina, mas é dificultado pela toxicidade do medicamento e por seus efeitos colaterais, especialmente nos primeiros meses da gestação. Assim, é fundamental a busca por outras estratégias terapêuticas com destaque para os fitoterápicos e plantas medicinais, os quais podem apresentar menos reações adversas ao longo do tratamento. Nesse sentido, muitos compostos de diferentes espécies vegetais têm sido estudados, e estes ensaios mostram seus diversos potenciais terapêuticos. A romã (*Punica granatum* L.) está presente em diversos estudos que evidenciam sua atividade antifúngica, antiviral, antimetastática e anti-inflamatória. Entretanto, ainda não há estudos que demonstrem sua atividade contra *T. gondii*, especialmente na interface materno-fetal. Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação dos efeitos *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* na infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas extravilosas (HTR-8/SVneo), em etapas iniciais e tardias. Foi avaliada a citotoxicidade do composto em diferentes concentrações, no qual foi observado que somente a maior concentração foi tóxica para as células, ao passo que as demais concentrações não-tóxicas controlaram a proliferação intracelular do parasito. Ademais, o pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com o extrato alterou a morfologia do parasito, dificultando sua invasão e proliferação. Além disso, o tratamento com este composto também mostrou uma reação antiparasitária irreversível. Isto posto, através destes estudos foi possível concluir que o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* foi eficaz no controle da infecção, o que demonstra seu possível potencial terapêutico no tratamento desta infecção.

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita. Tratamento fitoterápico. *Toxoplasma gondii*. Extrato de *Punica granatum*. HTR-8/SVneo.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that causes toxoplasmosis. In immunocompetent individuals, this infection is usually asymptomatic. However, in pregnant women, congenital toxoplasmosis is more severe and is caused by the passage of tachyzoites through the placental barrier, reaching the fetus. In this context, the infection can cause several damages in the embryo development. The conventional treatment involves a combination of two drugs, sulfadiazine and pyrimethamine, but is impaired by the medication's toxicity and its side effects, especially in the early stage of pregnancy. Thus, it is essential to explore other therapeutic strategies, especially phytotherapy and medicinal plants, which may have less adverse reactions throughout the treatment. In this sense, many compounds from different plant species have been studied, showing therapeutic potentials. Pomegranate (*Punica granatum* L.) is present in many studies highlighting its antifungal, antiviral, anti-metastatic, and anti-inflammatory activities. However, there are no studies showing its activity against *T. gondii*, especially in the maternal-fetal interface. Therefore, this study aimed to evaluate the *in vitro* effects of the hidroalcoholic extract from the peel of *P. granatum* fruit on *T. gondii* infection in human extravillous trophoblastic cells (HTR-8/SVneo), in early and late stages. The cytotoxicity of the compound at different concentrations was evaluated, and it showed that only the highest concentration was toxic to the cells, while the others non-toxic controlled the intracellular parasite proliferation. Furthermore, pre-treating *T. gondii* tachyzoites with the extract changed the parasite's morphology, hindering its invasion and proliferation. In addition, the treatment with this compound also showed an irreversible antiparasitic reaction. Therefore, these studies concluded that treatment with the hidroalcoholic extract of *P. granatum* was effective in the infection control, proofing its potential therapeutic value in the treatment of the infection.

Key-words: Congenital toxoplasmosis. Herbal treatment. *Toxoplasma gondii*. Pomegranate extract. HTR-8/SVneo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : características gerais e ciclo de vida	11
1.2 Toxoplasmose	12
1.3 Toxoplasmose congênita	14
1.4 Tratamento	15
1.5 Plantas medicinais com atividade antiparasitária	17
1.6 <i>Punica granatum</i> L.	18
1.7 Linhagem HTR-8/SVneo	20
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Extrato hidroalcoólico da casca do fruto de <i>P. granatum</i> L.	23
4.2 Cultivo de células	23
4.3 Cultivo do parasito	23
4.4. Ensaio de viabilidade celular	24
4.5 Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i>	24
4.6. Ensaio de invasão e proliferação de taquizoítos de <i>T. gondii</i> pré-tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>P. granatum</i>	26
4.7 Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
4.8 Ensaio de reversibilidade	27
4.9 Análise estatística	28
5. RESULTADOS	28
5.1 O extrato hidroalcoólico da casca do fruto de <i>P. granatum</i> foi tóxico para as células apenas na maior concentração	28
5.2 O extrato hidroalcoólico da casca do fruto de <i>P. granatum</i> reduziu a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células HTR-8/SVneo	29
5.3 O pré-tratamento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> altera sua morfologia, comprometendo sua capacidade de invasão e proliferação intracelular em células HTR-8/SVneo	30
5.4 Concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>P. granatum</i> mantiveram seu efeito antiproliferativo	32

6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	37
8. REFERÊNCIAS	38
9. ANEXOS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*: características gerais e ciclo de vida

Toxoplasma gondii é um protozoário cosmopolita e parasito intracelular obrigatório de vários animais homeotérmicos, como seres humanos (DUBEY, 2010; TENTER *et al.*, 2000). O sucesso evolutivo desta espécie é garantido, dentre outros fatores, por seu comportamento generalista, ou seja, por sua capacidade de infectar diferentes tipos celulares de diferentes hospedeiros (SOUZA, 2010; TONG *et al.*, 2021).

No Brasil, *T. gondii* foi primeiramente descrito por Splendore, em 1908, e, no mesmo ano, Nicolle e Manceaux descreveram a presença de taquizoítos nos tecidos de um roedor africano, *Ctenodactylus gundi* (DUBEY, 2009). Em 1909, Nicolle e Manceaux também denominaram o gênero *Toxoplasma*, cujo nome se refere ao formato de meia-lua do taquizoíto (DUBEY, 1998; FORTES, 1993; SOUZA, 2010). *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa, cuja característica do grupo é a presença do complexo apical em sua região anterior, a qual se caracteriza por um conjunto de organelas especializadas formadas pelo conóide, micronemas, roptrias, anel polar, grânulos densos e microtúbulos provenientes do citoesqueleto, as quais secretam ativamente proteínas e lipídeos, responsáveis pela adesão e invasão do parasito na célula hospedeira (DUBEY, 1998; CARRUTHERS, 2002; BLADER *et al.*, 2015; NEVES, 2016). Sendo um parasito intracelular obrigatório, este organismo conta com este sistema de invasão muito eficiente, garantindo sua transmissão e sobrevivência nas células hospedeiras (TEO *et al.*, 2007).

Em relação à morfologia, *T. gondii* apresenta três formas evolutivas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (SOUZA, 2010; NEVES, 2016), e seu ciclo de vida é heteroxeno facultativo, com uma fase sexuada, presente em seus hospedeiros definitivos (gêneros *Felis* e *Lynx*), e uma fase assexuada em seus hospedeiros paratênicos ou intermediários, como humanos e outros animais de sangue quente (NEVES, 2016), os quais podem ser infectados pelo consumo de carne crua contaminada contendo cistos ou água e alimentos contaminados com oocistos maduros (REY, 2001).

Os taquizoítos, como já mencionado, possuem uma forma de arco, estão presentes na fase aguda da infecção e são de proliferação rápida. Já os bradizoítos, de morfologia semelhante aos taquizoítos, constituem a forma cística da doença; são de multiplicação lenta e, devido a sua resistência ao sistema imune, podem passar longos períodos

encistados nos tecidos do hospedeiro (SOUZA, 2010). Em casos de imunossupressão do indivíduo, os bradizoítos podem retornar à atividade, mudando-se em taquizoítos e culminando na reagudização da doença. Os esporozoítos, por sua vez, são abrigados dentro dos oocistos, os quais são liberados ainda imaturos junto às fezes do hospedeiro definitivo, tornando-se infectantes em situações ambientais favoráveis (DUBEY, 1998; JEFFERS *et al.*, 2018; SOUZA, 2010).

A infecção por *Toxoplasma gondii* pode ocorrer pelo contato direto com as fezes de gatos ou outros felídeos infectados, pela ingestão de oocistos presentes em água ou alimentos contaminados, como carnes cruas ou malpassadas contendo os cistos teciduais (bradizoítos), por transplante de órgãos ou transfusão sanguínea de doadores infectados (NEVES, 2016). Após a ingestão, os cistos contendo bradizoítos ou oocistos cheios de esporozoítos são rompidos no estômago, liberando os parasitos que penetrarão na mucosa do intestino delgado e se mudarão em taquizoítos, os quais parasitam ativamente várias células do organismo, reproduzindo-se e proliferando por endodiogenia, reprodução assexuada na qual as células-filhas são formadas no interior da célula-mãe. Assim, novos taquizoítos serão liberados na corrente sanguínea e irão parasitar outras células. Durante a infecção, podem ser formados cistos no tecido nervoso e nos músculos, culminando na cronificação da doença (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Nos felinos (hospedeiros definitivos) ocorre a fase sexuada. Após a ingestão de cistos contendo bradizoítos pelos felinos, há a liberação de parasitos na mucosa gástrica, os quais migram para o epitélio intestinal e 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 os oocistos. Após cair na luz intestinal, os oocistos, os quais abrigam os esporozoítos, são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014; AL-MALKI, 2021). Para os seres humanos, além das vias de transmissão já citadas, há também a transmissão vertical, isto é, da mãe para o feto (JONES *et al.*, 2003; TONG *et al.*, 2021).

1.2 Toxoplasmose

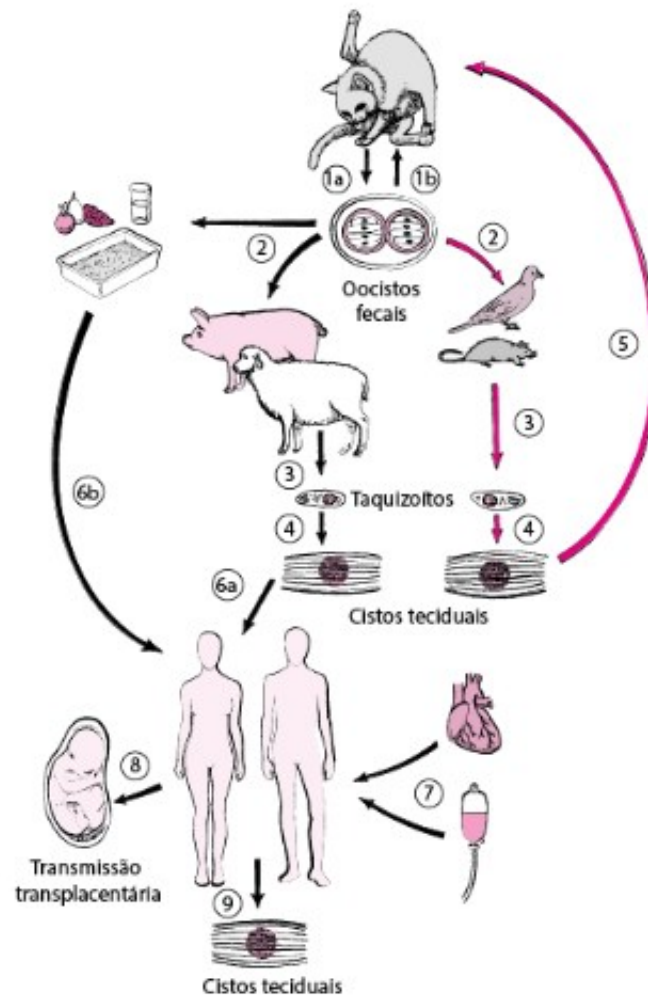
Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose, uma importante doença

de ampla prevalência e distribuição, acometendo cerca de um terço da população mundial (YAN, 2016; TONG *et al.*, 2021). Na América Latina e países tropicais africanos, por exemplo, a prevalência é alta, podendo variar de 30 a 90% (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; DUBEY *et al.*, 2014). A transmissão pode ocorrer por ingestão dos oocistos em água e alimentos contaminados, transplante ou transfusão sanguínea de doadores infectados, ou por via transplacentária, da mãe para o feto (TENTER, 2000; SOUZA, 2010; NEVES, 2016).

Os sintomas da toxoplasmose são variáveis. Na fase aguda, por exemplo, a disseminação é rápida; febre, dores musculares, dores de cabeça e alterações da visão devido à presença de parasitos na retina podem aparecer. Além disso, a alta concentração de parasitos no sangue colabora para um alto índice de disseminação pelo organismo. Neste período, a doença torna-se perigosa para indivíduos imunodeficientes e durante a gestação (TENTER, 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Para indivíduos imunocompetentes, por sua vez, seu sistema imunológico age encistando os bradizoítos, culminando na fase crônica da doença, que é, geralmente, assintomática (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Um outro fator que interfere na manifestação de sintomas é a variedade de cepas, as quais podem ser mais ou menos virulentas (SIBLEY *et al.*, 2009). A linhagem clonal tipo I está geralmente associada a manifestações de doenças oculares graves. A linhagem II, por sua vez, está presente em casos de infecção crônica, infecção congênita e em pacientes imunodeficientes; já a cepa tipo III está presente em outros animais: e em humanos é normalmente assintomática (SIBLEY *et al.*, 2009). Há, ainda, algumas cepas, denominadas recombinantes ou exóticas, que são encontradas principalmente na África e América do Sul, e estão relacionadas com toxoplasmoses ocular e congênita (PETERSEN, 2007; DUBEY, 2012).

Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*



Fonte: MSD Manuals

1.3 Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita é vista como uma das formas mais graves da doença e a incidência global chega a cerca de 190 mil casos por ano (TORGERSON, MASTROIACOVO, 2013). No estado de Minas Gerais, há uma prevalência de 13 casos (recém-nascidos) a cada 10.000 nascimentos (CARELLOS *et al.*, 2013). Apesar de sua importante função protetora, a barreira placentária pode não resistir à infecção, e os taquizoítos podem atravessá-la (JEFFERS *et al.*, 2019) e infectar o feto, devido a imunossupressão natural decorrente da gravidez (JONES *et al.*, 2003). Alguns estudos mostram que a reativação da doença pode ocorrer durante a gravidez e, neste caso, pode resultar em efeitos adversos para o feto em desenvolvimento (CARLIER *et al.*, 2012). A infecção prévia ou durante a gestação pode prejudicar a saúde do feto, podendo causar danos no sistema nervoso, retinocoroidite, hidrocefalia, calcificações intracranianas,

crescimento fetal prejudicado e até a perda gestacional (JONES *et al.*, 2003; FALLAHI *et al.*, 2018).

Quando a mãe é infectada no primeiro trimestre de gestação, as chances de infecção do feto são mais baixas, mas a doença é mais severa nesta idade. Por outro lado, quando a infecção se dá no terceiro trimestre, os riscos de transmissão ao feto são maiores, ao passo que o comprometimento fetal é menor (DUNN *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 2003). No início da gestação, a barreira placentária atinge uma espessura de 50-100 μm e diminui progressivamente para 2,5-5 μm no final da gravidez, o que facilita a invasão de patógenos nos trofoblastos (BLASZKOWSKA; GÓRALSKA, 2014; HOO; NAKIMULI; VENTO-TORMO, 2020). Em adição, à medida em que a gestação evolui, a camada de trofoblastos vilosos se torna descontínua e diminui sua capacidade proliferativa, tornando a camada de sinciciotrofoblasto mais fina e descontínua, o que diminui a barreira placentária (CARLIER *et al.*, 2012; ROBBINS *et al.*, 2012). O feto, o recém-nascido e o lactente jovem com infecção congênita por *T. gondii* podem apresentar complicações associadas à infecção, como complicações na retina que podem chegar à idade adulta. Os bebês diagnosticados com toxoplasmose congênita no pré-natal são tratados no pós-natal, independentemente de o tratamento da mãe ter sido realizado ainda na gravidez (TORQUATO, 2022).

1.4 Tratamento

Uma vez diagnosticada a infecção sem que os taquizoítos tenham, ainda, infectado o feto, é indicada à gestante o uso de espiramicina, um antibiótico que previne a transmissão ao feto (REMINGTON *et al.*, 2010; SERRANTI; BUONSENSO; VALENTINI, 2011; PEYRON *et al.*, 2017). Porém, este medicamento não é capaz de atravessar a placenta e, portanto, não se torna eficaz quando a infecção congênita é confirmada (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

Neste contexto, as drogas de primeira escolha são uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina com suplementação de ácido fólico, e estes medicamentos desempenham uma atividade sinérgica contra a replicação do taquizoíto, através da inibição sequencial de enzimas como a dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR). Estas proteínas, por sua vez, são responsáveis pela síntese de compostos de folato, muito importantes na formação de ácidos nucleicos e consequente replicação do parasito (ANDERSON, 2005; DOLIWA *et al.*, 2013). Existem, ainda,

drogas de segunda, terceira e quarta escolhas, respectivamente, como sulfadoxina + pirimetamina, com suplementação de ácido fólico, a associação entre sulfametoxazol, trimetoprim e espiramicina e azitromocina + pirimetamina com a suplementação de ácido fólico (VALENTINI *et al.*, 2015; PEYRON, 2019).

Apesar da fundamental importância do tratamento convencional para o controle da infecção, estes medicamentos podem ser tóxicos, além da eficácia restrita à fase aguda da doença (MONTOYA; REMINGTON, 2008). Além disso, estudos mostram que *T. gondii* possui um potencial adaptativo, o que culmina em parasitos resistentes à ação dos fármacos convencionalmente utilizados (SILVA *et al.*, 2017). Ademais, há muitos efeitos adversos descritos: o uso de pirimetamina durante o primeiro trimestre de gestação não é indicado por ser um medicamento que apresenta efeitos teratogênicos, como supressão da medula óssea, anemia, leucopenia e hipersensibilidades (MONTOYA; REMINGTON, 2008; OZ, 2014; PETERSEN apud. MARTÍNEZ, 2023). Neste contexto, o tratamento para toxoplasmose congênita ainda é limitado, afetando a qualidade de vida e a saúde da gestante e do feto (TEIXEIRA *et al.*, 2020)

Portanto, em decorrência dos efeitos adversos causados pelo tratamento convencional, é importante considerar o estudo e o desenvolvimento de tratamentos alternativos. Novos estudos apontam azitromicina com potencial terapêutico na interface materno-fetal (FRANCO *et al.*, 2011; CASTRO-FILICE *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2017; FRANCO *et al.*, 2019) e enrofloxacin e toltrazuril também têm sido vistos como estratégias alternativas para prevenir ou tratar a toxoplasmose congênita em modelos experimentais como primeiros estudos destas formas alternativas (SILVA *et al.*, 2017). Além destes, nanopartículas também têm sido estudadas como alternativas eficazes no combate à proliferação parasitária em modelos experimentais (COSTA *et al.*, 2021).

Adicionalmente, produtos naturais também têm sido estudados e demonstram um potencial promissor para o tratamento contra toxoplasmose (PORTES *et al.*, 2012; LEESOMBUN, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ *et al.*, 2023; TEIXEIRA *et al.*, 2023; TEIXEIRA *et al.*, 2023;), especialmente por suas atividades antiparasitárias e baixa toxicidade para as células.

1.5 Plantas medicinais com atividade antiparasitária

O uso de plantas para fins medicinais está presente na sociedade desde a antiguidade. No entanto, o mercado fitoterápico teve uma queda com o advento das indústrias farmacêuticas, estimulando o uso de fármacos sintéticos (RATES, 2001). No entanto, com o aprimoramento das tecnologias de exploração e isolamento dos compostos das plantas, tem sido observada uma potência na medicina fitoterápica, além da significativa redução da toxicidade dos compostos, aumentando sua eficiência em diversos tratamentos (GADELHA *et al.*, 2013). Nesse sentido, a busca por ferramentas terapêuticas alternativas, principalmente na linha de fitoterápicos e produtos naturais, têm ganhado atenção; isto porque, além dos efeitos promissores observados, estes medicamentos são menos tóxicos e podem diminuir os efeitos colaterais associados ao tratamento convencional (SHARIF, *et al.*, 2016).

A nível mundial, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas patologias e, deste número, muitos países em desenvolvimento dispõem somente destes compostos para o tratamento, em decorrência da pobreza ou falta de acesso a outros medicamentos, uma vez que plantas medicinais são de fácil obtenção e uso tradicional, por meio de chás, infusões, extratos brutos e medicamentos fitoterápicos (RATES, 2001; FIRMO *et al.*, 2012).

Segundo a Anvisa, uma planta é considerada medicinal quando possui substâncias que, quando administradas ao ser humano, podem prevenir, curar ou tratar doenças. No Brasil, a comercialização de plantas medicinais é feita, de modo geral, em farmácias, feiras livres e lojas de produtos naturais, mas, na maioria das vezes, não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa. Portanto, é fundamental o estudo e a comprovação das propriedades biológicas para garantir a eficácia, segurança e qualidade das plantas e de seus tratamentos derivados (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As atividades terapêuticas de plantas medicinais são associadas às atividades de seus compostos contra infecções diversas. Por exemplo, *Raphanus sativus*, *Cuminum cyminum*, e *Ceratonia siliqua* já têm demonstrado ações antiparasitárias contra *T. gondii* em estudos *in vitro* (ELAZAB; ARAFA, 2022). Outro estudo demonstrou o potencial

anti-*Toxoplasma* do óleo essencial de *Allium sativum* em estudos *in vitro* e *in vivo*, constatando um efeito profilático e uma importante redução na carga parasitária, além de promover o sistema imunológico inato em camundongos frente a infecção por *T. gondii*. Ademais, extratos diversos de *Punica granatum* têm apresentado atividades antimetastáticas e antitumorais, além de um importante combate ao estresse oxidativo em células trofoblásticas (CHEN *et al.*, 2012) e combate à neurotoxoplasmose *in vivo* (CHEN *et al.*, 2020).

As atividades terapêuticas de *Punica* são atribuídas, ademais, a seus compostos e propriedades diversas. Neste contexto, compostos fenólicos, por exemplo, podem apresentar propriedades antiinflamatórias e antioxidantes. Estas substâncias são oriundas do metabolismo vegetal, e estão presentes na maioria de seus frutos. A inserção dessas plantas na dieta pode contribuir para a redução do desenvolvimento de alguns tipos de câncer e doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas (FISCHER *et al.*, 2011).

Portanto, de acordo com estes aspectos, é importante considerar compostos derivados de plantas como uma fonte de novas substâncias bioativas com potencial biotecnológico para o tratamento de doenças parasitárias, incluindo a toxoplasmose congênita, tornando expressivo o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas a partir destes vegetais no tratamento desta infecção.

1.6 *Punica granatum* L.

A romã (*Punica granatum* L.) pertence à ordem *Myrtales* e à família *Lythraceae* e seu gênero foi classificado pela primeira vez em 1753 por Linnaeus. É uma planta nativa da Pérsia, embora se discuta sua origem na Ásia, particularmente no Irã, de onde se disseminou para o restante do planeta (SIMMONDS, 1976; HARLAN, 1992). Há duas espécies que compõem o gênero, *Punica granatum* e *Punica protopunica*, sendo esta última endêmica da ilha de Socotra, no Iêmen (DE LIMA; LOPES; RIBEIRO, 2021) e o parente mais próximo da romã cultivada. *Punica nana*, por sua vez, é uma outra forma de *Punica granatum* e tem sido tratada como uma terceira espécie do gênero (MELGAREJO; MARTÍNEZ, 1992).

Romãs são cultivadas em muitos países e seu potencial médico tem sido explorado em diversas áreas (SANTIAGO *et al.*, 2014; VENUSOVA *et al.*, 2021). As múltiplas

propriedades terapêuticas de *P. granatum* incluem potenciais antifúngicos, antibacterianos, antiinflamatórios e antimetastáticos (ABDOLLAHZADEH, 2011; VENUSOVA *et al.*, 2021). Essas atividades têm sido atribuídas aos polifenóis muito presentes no mesocarpo e na casca do fruto, com destaque para a punicalagina, um tanino hidrolisável de grande potencial antioxidante e combatente de radicais livres (FISCHER, 2011; SANTIAGO *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2018). Recentemente, a romã tem sido observada em tratamentos para muitas doenças, incluindo diabetes, obesidade, Alzheimer, artrite, vaginites, infertilidade masculina e tumores diversos (ABDOLLAHZADEH, 2011; MODAEINAMA *et al.*, 2015; EGHBALI, 2021; SINGH *et al.*, 2023). A punicalagina também mostrou estimular a apoptose de células cancerosas (SEPEHR *et al.*, 2012; MODAEINAMA *et al.*, 2015; KETA *et al.*, 2020), inibindo o seu crescimento e proliferação, e a modulação de respostas inflamatórias (BIALONSKA, 2010; LIN *et al.*, 2013). Além disso, tem sido observado um importante papel como um antiviral de amplo espectro, uma vez que age na interação vírus-célula hospedeira (MORADI *et al.*, 2019; SALLES *et al.*, 2021).

A casca do fruto de *P. granatum* demonstra uma elevada concentração de polifenóis, os quais representam a classe predominante de fitoquímicos presentes nos frutos de romã, consistindo principalmente em taninos hidrolisáveis. Estes compostos fenólicos podem ser muito benéficos, por meio de sua capacidade de captura de radicais livres e potencial antioxidante. Entre eles, estão os taninos hidrolisáveis, que estão principalmente localizados na casca e no mesocarpo da romã (FISHER *et al.*, 2010). Esses taninos, por sua vez, possuem dois subtipos: os galotaninos e os elagitaninos (MONTEIRO *et al.*, 2005), e a punicalagina, um tanino hidrolisável pertencente aos elagitaninos, é destaque nos estudos relacionados ao seu potencial terapêutico para diversas doenças virais, apoptose de células trofoblásticas e células tumorais (CHEN *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2013; KETA *et al.*, 2020; VENUSOVA *et al.*, 2021).

Um outro estudo de Tan e colaboradores (2020) demonstrou que a uritolina-A, um metabólito intestinal produzido a partir do consumo de alimentos ricos em elagitaninos, mostrou-se eficaz como neuroprotetor ao reduzir a carga parasitária de *T. gondii* em cistos encefálicos em camundongos infectados pelo parasito, além de melhorar a percepção de risco frente a estímulos predatórios, configurando-se como um promissor tratamento natural para o tratamento de neurotoxoplasmose em estágios agudos e crônicos da infecção.

Além disso, o extrato da casca da romã, onde estes compostos estão abundantemente presentes, também tem sido estudado por sua eficiente atividade antimicrobiana (MAHMOOD *et al.*, 2021), além de induzir apoptose em células cancerosas (KETA *et al.*, 2020) e neutralizar o estresse oxidativo induzido por antibióticos e lesões testiculares em ratos (EL-DEMERDASH *et al.*, 2023), quanto reduzir apoptose em células trofoblásticas humanas, mostrando-se importante para a manutenção da barreira placentária (CHEN *et al.*, 2012).

Apesar de estudadas e aplicadas em diversos tratamentos, as atividades e potenciais biológicos de *Punica granatum* ainda são pouco explorados, principalmente em relação à toxoplasmose congênita. Além disso, não há nada na literatura científica até o momento evidenciando sua influência na infecção por *T. gondii* em modelos de interface materno-fetal humana.

1.7 Populações celulares da placenta

A placenta humana é um importante órgão fetal responsável pela nutrição, trocas gasosas e eliminação de excretas fetais (CORRÊA *et al.*, 2006), e é composta por vilosidades flutuantes e de ancoragem. É importante que seu bom funcionamento seja garantido, pois esta estrutura também é uma barreira física fundamental para proteger o feto contra a ação de patógenos (LIEMPI *et al.*, 2014; ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019), e lesões teciduais podem causar intercorrências fetais (TRAVERS; SCHMIDT, 1991 *apud*. CORRÊA *et al.*, 2006).

O trofoblasto, por sua vez, é uma célula de origem fetal que apresenta várias funções, as quais promovem o sucesso gestacional, além de ser responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio, pela nutrição do embrião, pela regulação hormonal e por formar a porção fetal da placenta (FITZGERALD *et al.*, 2008; POLLHEIMER; KNÖFLER 2018). Além disso, estas células participam efetivamente da comunicação na interface materno-fetal e da produção de moléculas sinalizadoras e mediadores químicos (BARBOSA *et al.*, 2014).

Durante o processo de implantação, o trofoblasto se diferencia em duas subpopulações: o sinciotrofoblasto e o citotrofoblasto (WHARTON *et al.*, 1993; CEBALLOS-POMARES *et al.*, 2017). O sinciotrofoblasto é uma camada multinucleada com limites celulares não definidos que forma a superfície externa dos

vilos placentários e entra em contato direto com o sangue materno, e se forma a partir de células do citotrofoblasto (HUPPERTZ; GAUSTER, 2011; MAYHEW, 2014). O citotrofoblasto, por sua vez, é formado por células individualizadas, com elevada capacidade proliferativa, e também se divide em: trofoblasto viloso, fundamental para a troca de nutrientes e resíduos entre mãe e feto, e trofoblasto extraviloso, que é responsável pela migração e invasão na decídua materna (MIDGLEY *et al.*, 1963).

Neste contexto, diversos estudos *in vitro* são realizados a partir do uso de linhagens celulares trofoblásticas pré-estabelecidas, buscando, enfim, compreender o papel do trofoblasto no ambiente materno-fetal e a resposta imune na gravidez, principalmente na presença de *T. gondii*. Células HTR-8/SVneo são representantes de trofoblasto extraviloso humano e 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).

Esta linhagem celular apresenta propriedades semelhantes ao trofoblasto primário, e são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, apresentando, também, produção de progesterona semelhantes às células trofoblásticas de primeiro trimestre, sendo assim, muito relevantes para o estudo da relação materno-fetal (MALASSINE; FRENDO; EVAÏN-BRITON, 2003; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). Portanto, a linhagem de células trofoblásticas extravilosas HTR-8/SVneo foi estudada neste trabalho devido à sua alta susceptibilidade à infecção por *T. gondii*, além de constituir um importante eixo entre a mãe e o feto, o qual pode ser um canal de passagem de taquizoítos pela interface materno-fetal, alcançando, neste caso, o feto e podendo culminar na infecção congênita.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é um grave problema de saúde pública a nível mundial e pode comprometer gravemente o desenvolvimento fetal, podendo causar desde danos neurológicos no feto até o aborto. Além disso, sabe-se que não existem medicamentos capazes de curar esta infecção, uma vez que estes são eficazes apenas na fase aguda da doença, e o tratamento convencional pode gerar severos efeitos colaterais, tanto para a gestante quanto para o feto. Em adição, ainda não existem vacinas contra a toxoplasmose,

além do surgimento de novas cepas de *T. gondii*, as quais se mostram resistentes ao tratamento convencional (SILVA *et al.*, 2017).

À luz de trabalhos já publicados, observa-se vários estudos que exploram os potenciais anti-inflamatórios, antiparasitários, antivirais, antifúngicos e até antimetastáticos da romã (*Punica granatum* L.). Entretanto, sua atividade ainda não foi estudada frente à infecção placentária por *T. gondii*. Portanto, o presente trabalho é justificado por investigar tais potenciais do extrato de *P. granatum* além de buscar novas estratégias terapêuticas para prevenir ou minimizar as taxas de infecção por este parasito, atuando como um possível tratamento para a doença, além de avaliar a ação do extrato na infecção por *T. gondii* em células HTR-8/SVneo, colaborando, assim, para o enriquecimento da bibliografia relacionada à interface materno-fetal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *Punica granatum* L. frente à infecção experimental por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas extravilosas (HTR-8/SVneo).

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico do fruto de *P. granatum* em células HTR-8/SVneo;
- b) Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo tratadas ou não com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum*;
- c) Avaliar a invasão, proliferação e morfologia de *T. gondii* pré-tratado com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* L. em células HTR-8/SVneo;
- d) Avaliar se o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* possui um impacto irreversível na proliferação de *T. gondii* mesmo após a remoção do tratamento.

4. METODOLOGIA

4.1 Extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* L.

O extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* foi gentilmente cedido pela professora Dra. Enyara Resende Moraes, Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Patos de Minas (Minas Gerais, Brasil). O extrato foi mantido em microtubos de 500µl, à concentração de 221.300 mg/mL (solução-mãe) e à temperatura de 4°C, fechados e ao abrigo de luz. Para cada experimento, previamente à sua realização, foram feitas soluções prévias, nas quais o extrato hidroalcoólico era diluído à concentração de 1000 µg/mL (solução-mãe + meio RPMI). A determinação das concentrações seguiu a ordem massa/volume (µg/mL).

4.2 Cultivo de células

As células trofoblásticas humanas extravilosas de linhagem HTR-8/SVneo foram cedidas pela professora 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 e, uma vez descongeladas, foram cultivadas em frascos de 75cm² contendo meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementadas com antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e soro fetal bovino (SFB, 5%). As células foram incubadas em estufa umidificada, à temperatura de 37°C e 5% de CO₂ (BARBOSA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2014). De acordo com o Comunicado N°13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da UFU declara que projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética pelo comitê (Anexo I).

4.3 Cultivo do parasito

Taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) expressando a enzima β-galactosidase foram mantidos em células HTR-8/SVneo cultivadas em meio RPMI (2% de SFB), em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (BARBOSA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2020).

4.4. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular de HTR-8/SVneo frente ao tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. granatum* foi verificada usando o ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983). Células HTR-8/SVneo ($1,5 \times 10^4$ /200 μ L) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio com 10% de SFB por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, as células foram tratadas com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 60, 100 e 250 μ g/mL). As concentrações utilizadas foram baseadas em estudos prévios que usaram o extrato da casca do fruto de *P. granatum* (ALI *et al.*, 2014; MODAEINAMA *et al.*, 2015; KETA *et al.*, 2020). Além disso, as células foram tratadas com 0,1125% de DMSO diluído em meio RPMI com 10% de SFB, o que corresponde à concentração de DMSO usada na maior concentração do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* (250 μ g/mL). As células foram tratadas com sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PIR; 100 + 4 μ g/mL) como controle positivo da reação (COSTA *et al.*, 2021). Como controle, as células foram somente tratadas com meio 10% de SFB.

Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram desprezados e as células foram incubadas com 10 μ L de MTT (5mg/mL) e 90 μ L de meio RPMI (10% SFB) em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 4h, foi acrescentado 100 μ L de uma solução que contém 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e N, N-dimetilformamida a 50% para solubilizar os cristais de formazan, incubando a placa *overnight* (MOSMANN, 1983). Em seguida, a leitura foi realizada em uma leitora de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e a densidade ótica (OD) foi obtida a um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células viáveis, viabilidade celular, comparando cada condição ao grupo controle, o qual expressa 100% de viabilidade celular. Foram realizados dois experimentos independentes com oito replicadas.

4.5 Proliferação intracelular de *T. gondii*

Após a avaliação da citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* L., através do ensaio do MTT em células HTR-8/SVneo, foram escolhidas as concentrações não tóxicas e foi avaliada, então, a proliferação intracelular de *T. gondii* nestas células. Células HTR-8/SVneo ($1,5 \times 10^4$ células/200 μ L) foram plaqueadas em

meio RPMI 10% SFB em placas de cultura de 96 poços e incubadas em estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, na proporção de 3 parasito por célula (3:1). Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas uma vez com PBS 1x estéril para remoção dos parasitos extracelulares, e tratadas com as concentrações não-tóxicas do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* (5, 10, 20, 40, 60, 100 µg/mL) por 24 horas nas mesmas condições em estufa. Em paralelo, como controle positivo da reação, um grupo de células foi tratado com sulfadiazina e pirimetamina (SDZ + PIR: 100 + 4 µg/mL) (DA SILVA *et al.*, 2017). Adicionalmente, células HTR-8/SVneo infectadas por *T. gondii* e não tratadas (meio RPMI 10% SFB) foram utilizadas como controles negativos.

A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de β-galactosidase (TEO *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2014). Após as 24 horas de tratamento, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi desprezado. Foram adicionados 100 µL/poço de tampão de lise (RIPA) [50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio e 0.1% de dodecil sulfato de sódio (SDS); pH 7.5], e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 160 µL de tampão de ensaio (100mM de tampão fosfato, pH 7,3, 102mM de β-mercaptoetanol, 9mM de MgCl₂) e, por fim, 40 µL de CPRG (clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo). A placa foi incubada à temperatura ambiente, ao abrigo de luz, e, posteriormente, lida em uma leitora de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), na qual a atividade enzimática foi medida em densidade ótica em um comprimento de onda de 570nm.

A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada e comparada com base em uma curva padrão de referência contendo taquizoítos livres em diluição seriada, de 1x10⁶ a 15,625x10³, com dados expressos em porcentagem. Assim, a média do controle (células infectadas e não tratadas) representa o total (100%) de proliferação. Portanto, cada condição será comparada com tal valor de referência (TEIXEIRA *et al.*, 2020). Foram realizados três experimentos com oito repetições.

4.6. Ensaio de invasão e proliferação de taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum*

Células HTR-8/SVneo ($1,5 \times 10^4$ células/200 μ L) foram plaqueadas em meio RPMI 10% SFB em duas placas de cultura de 96 poços e incubadas a 37°C em estufa umidificada a 5% de CO₂. Após 24 horas, taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados em microtubos por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂ com três concentrações do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* (40, 60 e 100 μ g/mL), as quais apresentaram uma melhor inibição da proliferação intracelular do parasito. Nestas mesmas condições, de modo paralelo, os taquizoítos foram pré-incubados com SDZ + PIR em concentrações de 100 + 4 μ g/mL ou, para o grupo não tratado, pré-incubados apenas com meio de cultura (RPMI, 2% SFB). Em seguida, os microtubos contendo os parasitos foram centrifugados a 2000 rotações por minuto (RPM) por 7 minutos, e ressuspensos em meio RPMI 10% SFB. Posteriormente, as células HTR-8/SVneo foram infectadas pelos parasitos, pré-tratados ou não, na proporção 3:1, por 3 horas.

Após o período de infecção, dois protocolos experimentais distintos foram analisados: (I) invasão: após as 3 horas, uma placa foi lavada uma vez com PBS 1x, para a remoção dos parasitos extracelulares, e foi realizado o ensaio de β -galactosidase, já descrito anteriormente, com o objetivo de analisar a taxa de invasão do parasito; (II) proliferação: após as 3 horas, a outra placa foi lavada com PBS 1x para a remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com meio RPMI a 10% de SFB por 24 horas. Após este período, foi realizado o ensaio de β -galactosidase para obter a taxa de proliferação do parasito.

Células HTR-8/SVneo infectadas e tratadas apenas com meio RPMI (controle negativo), representaram crescimento de parasitos não inibido. A média de células não tratadas corresponde a 100% de proliferação parasitária para cada ensaio. Os demais valores foram comparados a este grupo, e os dados demonstraram em porcentagem de invasão ou de proliferação de *T. gondii*. Foram realizados três experimentos independentes, em oito replicadas.

4.7 Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O ensaio de microscopia eletrônica de varredura foi realizado com o objetivo de observar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* na morfologia dos

taquizoítos de *T. gondii*. Para tanto, os parasitos foram cultivados e foram pré-tratados com uma concentração do extrato de *P. granatum*, a qual apresentou um maior controle da invasão e proliferação do parasito. Paralelamente, taquizoítos também foram pré-tratados com SDZ + PIR (100 + 4 µg/mL) e o grupo controle, por sua vez, foi tratado com meio RPMI a 2% de SFB. Os taquizoítos foram incubados com os respectivos tratamentos por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂.

Após este período, o tratamento foi retirado e os parasitos foram lavados 1x com PBS. Em seguida, foram fixados em solução de Karnovsky contendo paraformaldeído (2%) e glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato de sódio (0,1M). Após 2 horas, os parasitos foram lavados 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós fixados com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% por mais 1 hora. Então, os parasitos foram lavados 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1M (MAGNO *et al.*, 2005; PORTES *et al.*, 2012). Adiante, foram aliqotados 10 µL de parasito e colocados sobre lamínulas de vidro circulares previamente depositadas em placa de cultura de 24 poços, a qual foi incubada à temperatura ambiente *overnight* até a secagem. Posteriormente, foi realizado o processo de desidratação, através da adição de concentrações crescentes de álcool (50, 70, 80, 90, 95 e 100%, 5 minutos em cada). Após a adição de álcool absoluto, enfim, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (Tescan, VEJA 3 LMU).

4.8 Ensaio de reversibilidade

Para verificar a manutenção dos efeitos antiparasitários do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* na proliferação de *T. gondii*, foi realizado o ensaio de reversibilidade (TEIXEIRA *et al.*, 2020). Células HTR-8/SVneo (1,5×10⁴ células/200 µL) foram plaqueadas em placas de 96 poços, em meio RPMI a 10% de SFB e incubadas em estufa, como já descrito. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (3:1) por 3 horas e, em seguida, lavadas com PBS 1x para remover o excesso de parasitos extracelulares. Então, foram realizados dois protocolos: (1) células HTR-8/SVneo foram tratadas com extrato hidroalcoólico de *P. granatum* em diferentes concentrações (40, 60 e 100 µg/mL), ou com SDZ + PIR (100 + 4 µg/mL), ou com meio RPMI, todos por 24 horas em estufa umidificada (37°C e 5% CO₂). Posteriormente, foi realizado o ensaio de β-galactosidase, como acima descrito, avaliando a proliferação intracelular de taquizoítos; e (2) células já infectadas por *T. gondii*, cultivadas nas mesmas condições descritas em (1), e após 24 horas de tratamento foram lavadas com PBS 1x e incubadas

com meio RPMI 10% SFB por mais 24 horas nas mesmas condições. Em seguida, também foi feito o ensaio de β -galactosidase.

Finalmente, foi medida a taxa de reversibilidade percentual (%) do tratamento 24 horas após a sua remoção, em comparação com o grupo não tratado (100% de reversibilidade) e a condição de tratamento correspondente em 24 horas de tratamento. Foram realizados dois experimentos independentes em oito repetições.

4.9 Análise estatística

As análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism® Version 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), submetendo os dados a testes de normalidade e, quando paramétricos, foram comparados usando o One-way ANOVA com pós-teste de comparações múltiplas por Bonferroni. Para valores considerados significativos, os valores de $P < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

5. RESULTADOS

5.1 O extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* foi tóxico para as células apenas na maior concentração

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de avaliar a possível citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* L. testado em células HTR-8/SVneo em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 60, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Após 24 horas, foi observado que o tratamento com o extrato hidroalcoólico reduziu significativamente a viabilidade celular apenas na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, quando comparado ao controle (células tratadas apenas com meio) (** $P = 0,0020$) (**Figura 1**). Além disso, observou-se que o diluente utilizado, DMSO, na concentração de 0,1125%, não foi capaz de diminuir a viabilidade das células em relação as células não tratadas (**Figura 1**). Células HTR-8/SVneo tratadas com a associação de sulfadiazina e pirimetamina (100 + 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) não apresentaram redução da viabilidade celular quando comparado com células não tratadas (**Figura 1**).

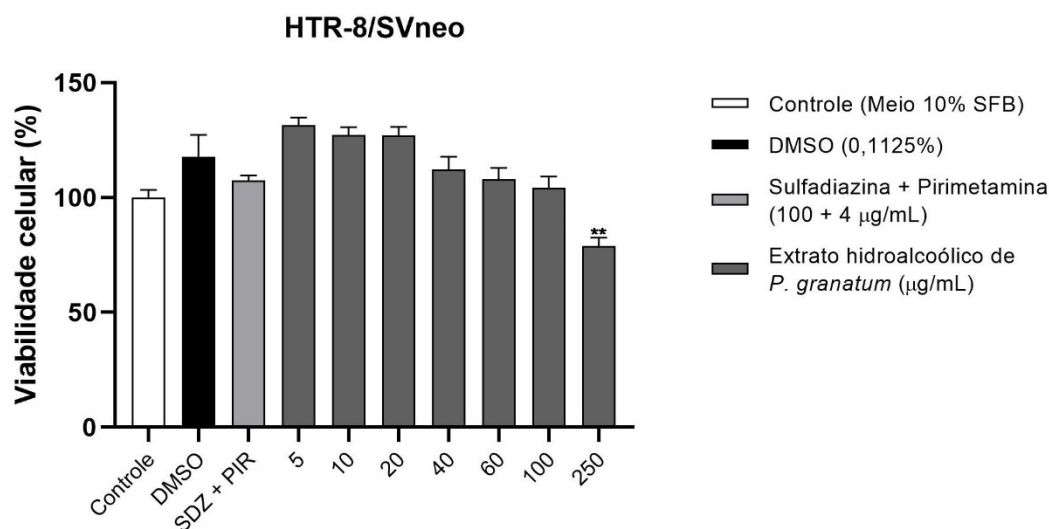


Figura 1 – Viabilidade de células HTR-8/SVneo tratadas ou não com extrato hidroalcoólico de *Punica granatum*. Células HTR-8/SVneo foram tratadas por 24 horas em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 60, 100 e 250 µg/mL) com extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum*. Os dados foram apresentados como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação às células tratadas com meio RPMI, 10% SFB (100% viáveis). As células também foram tratadas com sulfadiazina + pirimetamina (SDZ + PIR; 100 + 4 µg/mL, respectivamente) e DMSO 0,1125% (porcentagem presente na maior concentração do extrato). Foram realizados dois experimentos em oito repetições. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas por Bonferroni. Diferenças significativas em relação às células tratadas com meio. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5.2 O extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* reduziu a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo

No ensaio de viabilidade celular, foram estabelecidas as concentrações de extrato hidroalcoólico de *P. granatum* que não foram citotóxicas para células HTR-8/SVneo. Então, o ensaio de proliferação intracelular foi realizado para avaliar o impacto do tratamento com extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* em células HTR-8/SVneo infectadas com taquizoítos de *T. gondii*. Foi observado que o tratamento com o extrato hidroalcoólico nas concentrações estudadas, 5 (** $P = 0,0032$), 10 (* $P = 0,0156$), 20 µg/mL (** $P = 0,0242$), reduziu a proliferação intracelular do parasito em relação às células infectadas e não-tratadas (**Figura 2**), com destaque para as concentrações de 40 (** $P = 0,0012$), 60 (**** $P < 0,0001$), e 100 (**** $P < 0,0001$) µg/mL. Além disso, SDZ + PIR (100 + 4 µg/mL) também reduziram a proliferação de *T. gondii*, em comparação às células tratadas com meio (**** $P < 0,0001$). Estes resultados demonstram que o extrato

hidroalcoólico de *P. granatum* apresentou um efeito antiproliferativo contra *T. gondii* em células HTR-8/SVneo.

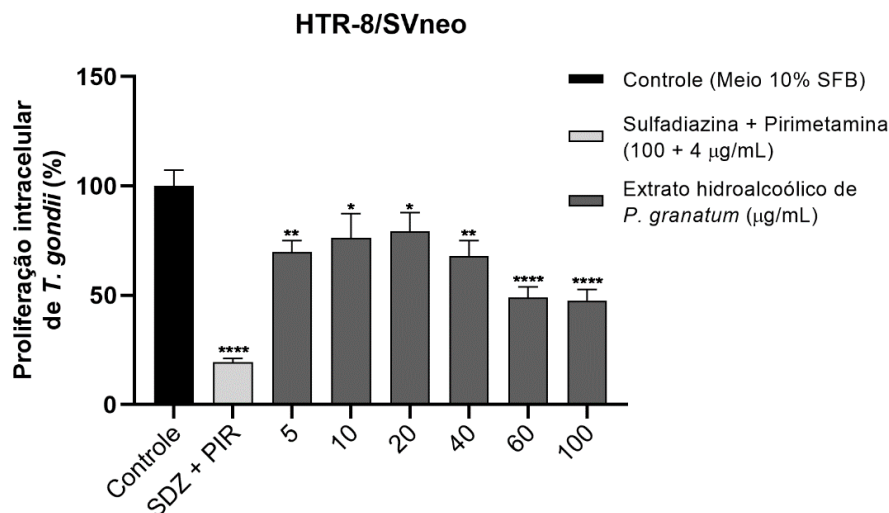


Figura 2: Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* em células HTR-8/SVneo tratadas com extrato hidroalcoólico de *P. granatum*. Células HTR-8/SVneo foram infectadas por *T. gondii* por 3 horas e posteriormente tratadas por 24 horas com as concentrações não tóxicas do extrato (5, 10, 20, 40, 60, 100 µg/mL) hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum*. Como controle, células HTR-8/SVneo foram tratadas somente com meio, considerando 100% de proliferação. As células infectadas também foram tratadas com sulfadiazina + pirimetamina (SDZ + PIR; 100 + 4 µg/mL, respectivamente). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de β-galactosidase e foi expressa em porcentagem. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5.3 O pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* altera sua morfologia, comprometendo sua capacidade de invasão e proliferação intracelular em células HTR-8/SVneo

Para avaliar o impacto do pré-tratamento com extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* sobre os taquizoítos de *T. gondii*, foi realizado o ensaio de invasão e proliferação intracelular, além da avaliação da morfologia do parasito por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As três concentrações de 40, 60 e 100 µg/mL foram escolhidas com base nos resultados do experimento de proliferação intracelular. No ensaio de invasão, foi observado que o pré-tratamento dos parasitos com as concentrações de 40 (** $P = 0,0004$), 60 (**** $P < 0,0001$) e 100 µg/mL (**** $P < 0,0001$) do extrato, diminuiu a porcentagem de

invasão de taquizoítos em células HTR-8/SVneo quando comparado ao controle não-tratado (**Figura 3A**). Além disso, o pré-tratamento dos taquizoítos nestas concentrações do extrato hidroalcoólico também controlou o percentual de proliferação intracelular em relação ao controle tratado somente com meio RPMI (**Figura 3B**). Por outro lado, o pré-tratamento de *T. gondii* com SDZ + PIR (100 + 4 µg/mL) não diminuiu a invasão e até induziu o aumento da invasão do parasito em células HTR-8/SVneo (** $P = 0,0032$) (**Figura 3A**). Porém, analisando o percentual de proliferação intracelular de *T. gondii*, a combinação SDZ + PIR, na mesma concentração, controlou as taxas de proliferação (* $P = 0,0305$), comparado ao controle não tratado (**Figura 3B**).

Para o ensaio de microscopia eletrônica de varredura, taquizoítos de *T. gondii* foram pré-tratados por 1 hora com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* na concentração de 60 µg/mL, a qual foi escolhida pela análise dos resultados nos experimentos de proliferação, com as células infectadas e posteriormente tratadas, e de invasão e proliferação com taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum*. Em seguida, foram feitas as etapas subsequentes já descritas. As imagens obtidas através deste ensaio mostraram que não há alterações morfológicas no grupo controle, correspondente ao parasito não tratado (meio RPMI 2% SFB) (**Figura C**). Para os parasitos tratados com SDZ + PIR (100 + 4 µg/mL), também não foram observadas grandes alterações morfológicas (**Figura D**), apenas um aspecto de torção no corpo do parasito; ao passo que, para os taquizoítos pré-tratados com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum*, houveram alterações morfológicas (**Figuras E, F, G, H**). Em (**E**) é possível observar uma diminuição ou retração do corpo do parasito, num aspecto de perda ou depleção de volume, além de uma estrutura semelhante a orifício (PORTES *et al.*, 2012). Também se observa um aspecto de torção do parasito em (**E**) e (**G**). Em (**E, F**) há, também, uma estrutura semelhante a orifício (setas), além da secreção de vesículas extracelulares (cabeça de setas), as quais podem surgir também em situações de estresse, e também podem ser vistas em (**E, F, G, H**). Em (**H**) é possível observar dois taquizoítos, os quais mostraram a morfologia corporal alterada, apresentando, além das vesículas extracelulares, algumas reentrâncias na membrana. Deste modo, percebe-se que as alterações morfológicas causadas pela ação do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum*, podem ter impedido ou dificultado a invasão dos taquizoítos de *T. gondii* e a sua proliferação intracelular.

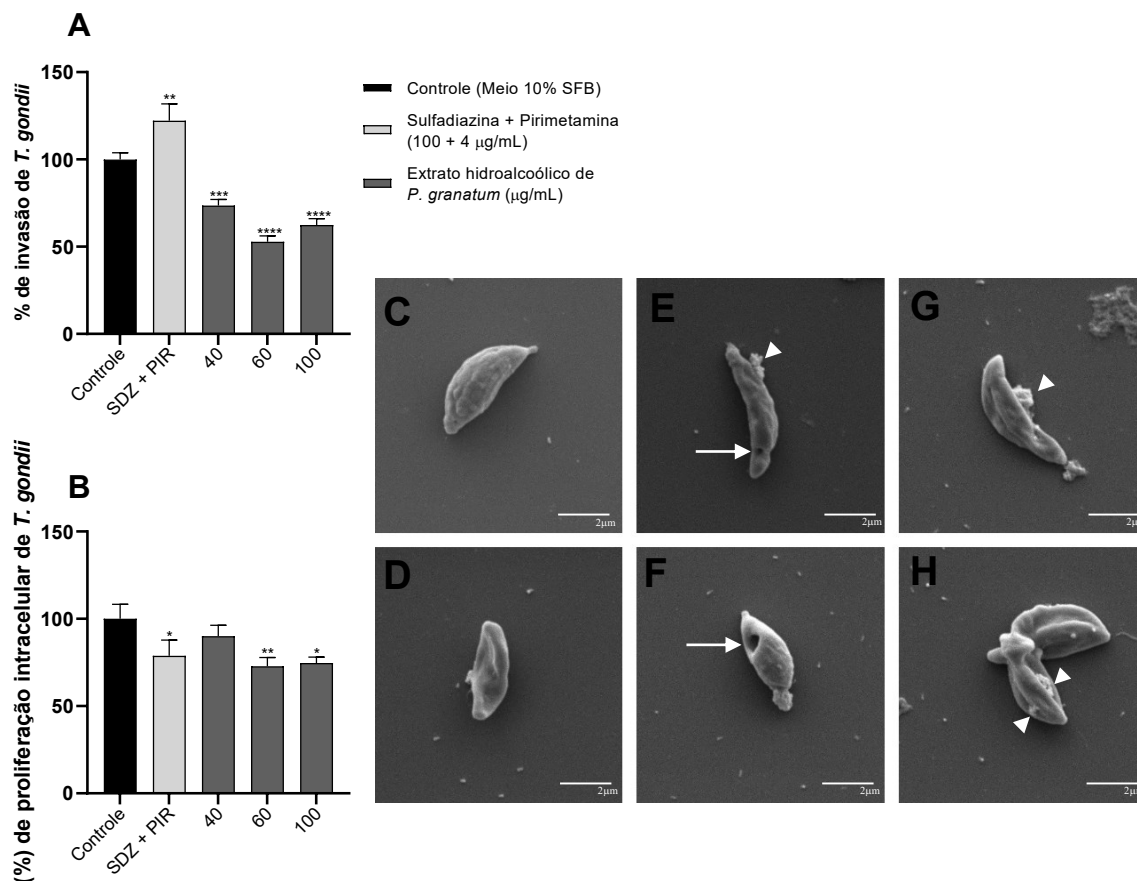


Figura 3: Ensaio de invasão, proliferação intracelular e morfologia de taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados com extrato hidroalcoólico de *P. granatum*. Células HTR-8/SVneo foram infectadas por taquizoítos de *T. gondii* previamente pré-tratados por 1 hora com extrato hidroalcoólico da casca do fruto (40, 60 e 100 µg/mL) de *P. granatum*. Foi analisada a porcentagem de invasão (A) e proliferação (B) através do ensaio de β-galactosidase. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças significativas são em relação às células infectadas com parasitos não tratados (meio). Foram realizados três experimentos independentes em oitoplicata. Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura de taquizoítos de *T. gondii* não tratados (C), tratados com SDZ + PIR (100 + 4 µg/mL) (D), e tratados com extrato hidroalcoólico a 60 µg/mL (E, F, G, H). As setas evidenciam as estruturas semelhantes a orifício, e as cabeças de seta evidenciam as vesículas extracelulares. Barra de escala: 2 µm.

5.4 Concentrações do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* mantiveram seu efeito antiproliferativo

Para determinar se os efeitos antiparasitários promovidos pelo extrato hidroalcoólico de *P. granatum* seriam reversíveis, células HTR-8/SVneo foram tratadas com o extrato por 24 horas. Após este período, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS 1x e incubadas com meio livre de tratamento (RPMI, 10% SFB) por mais 24

horas. Em paralelo, foi quantificada a porcentagem de proliferação parasitária intracelular após as 24 horas de tratamento, a fim de obter uma linha de base para comparação.

Para células HTR-8/SVneo, foram escolhidas as concentrações de 40, 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidroalcoólico, as quais, conforme demonstrado anteriormente (**Figuras 2 e 3**), reduziram a invasão e proliferação intracelular de *T. gondii*. Os dados obtidos mostram que as concentrações de 60 ($***P = 0,0003$) e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($****P < 0,0001$) controlaram a proliferação de *T. gondii*, quando comparadas às células tratadas somente com meio (**Figura 4**). Ademais, a combinação SDZ + PIR também reduziu a proliferação parasitária ($****P < 0,0001$) em relação ao grupo controle (células não tratadas). Interessantemente, as concentrações de 60 ($*P = 0,0284$) e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($****P = 0,0001$), além de controlarem a proliferação intracelular de *T. gondii*, também mantiveram seu efeito antiproliferativo 24 horas após a remoção do tratamento (**Figura 4**). Neste contexto, SDZ + PIR também apresentou efeito irreversível ($****P < 0,0001$) (**Figura 4**). Esses resultados demonstram que as duas concentrações acima mencionadas mantiveram seu efeito antiproliferativo mesmo após a remoção do tratamento.

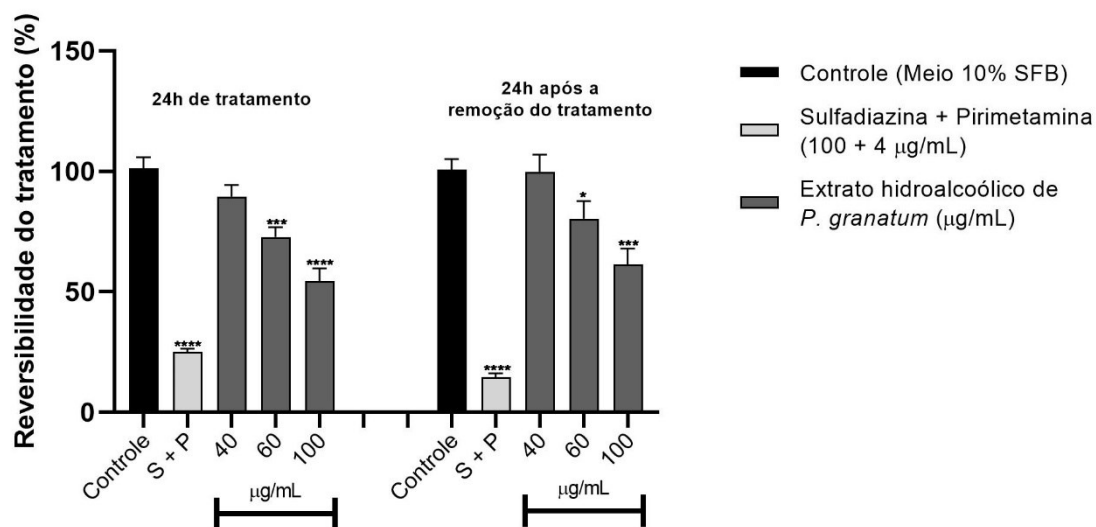


Figura 4: Avaliação da manutenção dos efeitos antiparasitários do extrato hidroalcoólico de *P. granatum* através do ensaio de reversibilidade. Células HTR-8/SVneo infectadas com *T. gondii* foram tratadas com 40, 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidroalcoólico de *P. granatum*, SDZ + PIR (100 + 4 $\mu\text{g/mL}$) ou apenas meio (RPMI, 10% SFB) por 24 horas, seguido pela remoção do tratamento por mais 24 horas. A proliferação dos parasitos com 24 horas de tratamento foi determinada como uma linha de base para a comparação. A taxa de reversibilidade em porcentagem (Reversibilidade do tratamento, %) foi determinada usando o teste de β -galactosidase para avaliar a capacidade de recuperação do parasito frente ao tratamento, e o grupo controle foi considerado como 100% de reversibilidade. Foram realizados dois experimentos independentes com oito repetições. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma doença parasitária importante e é considerada um problema de saúde pública global. Segundo Moura e colaboradores (2018), apesar da alta prevalência, fatores como hábitos de higiene e de manuseio e ingestão de alimentos, clima, temperatura e população de gatos também podem interferir na prevalência da infecção. No Brasil, estudos que analisaram o perfil soroepidemiológico da toxoplasmose mostraram que a infecção há uma prevalência de casos em cerca de 80% da população adulta, e a diversidade genética das cepas do parasito presentes no território nacional promovem diferenças nas formas clínicas da doença (RODRIGUES NJL, *et al.*, 2022).

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da doença, causando severas complicações na gestação, como danos neurológicos e oculares no feto, malformações e, até mesmo, aborto (JONES *et al.*, 2003; KIEFFER; WALLON, 2013). Nesse sentido, o diagnóstico precoce e o tratamento eficiente são fundamentais para a redução das consequências da doença nesse público (TORQUATO *et al.*, 2022). Nesse sentido, o tratamento convencional para toxoplasmose congênita, apesar da grande importância clínica para o controle da infecção, está relacionado a sérios efeitos colaterais causados tanto na mãe quanto no feto, além da eficácia restrita à fase aguda da doença (VIJAYALAXMI; VIJAYALAXMI, 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; MONTOYA; REMINGTON, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de *Punica granatum* L. no tratamento de diversas doenças, incluindo doenças parasitárias (ELTAYSH *et al.*, 2022). No entanto, ainda não há estudos que relacionem o tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) da casca do fruto de *P. granatum* com a atividade de *T. gondii*, especialmente na infecção placentária e interface materno-fetal. Deste modo, o presente estudo buscou avaliar os efeitos do EH no controle da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas extravilosas (linhagem HTR-8/SVneo), consideradas excelentes modelos experimentais para estudos relacionados à toxoplasmose congênita (DE SOUZA, *et al.*, 2021).

Inicialmente, para analisar o impacto do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* em células HTR-8/SVneo, foi realizado um ensaio de viabilidade das

células tratadas com diferentes concentrações do extrato. O ensaio de MTT foi realizado para determinar a viabilidade das células e os resultados mostraram que células HTR-8/SVneo tratadas com o extrato hidroalcoólico exibiram viabilidade celular reduzida apenas na maior concentração. Modaeinama e colaboradores (2015), demonstraram que o extrato da casca do fruto de *P. granatum* em células da linhagem HUVEC's não comprometeram sua viabilidade. Este mesmo trabalho evidencia, também, a necessidade de ampliar os estudos avaliativos da citotoxicidade dos extratos diversos de *P. granatum* em diferentes linhagens celulares. Nesse contexto, o presente estudo também se mostra importante para acrescentar às análises em relação à toxicidade do extrato em outros tipos celulares com destaque para os trofoblastos extravilosos, como a linhagem HTR-8/SVneo, uma vez que o extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* foi tóxico para essas células apenas na maior concentração testada.

Em seguida, células HTR-8/SVneo foram infectadas com *T. gondii* por 3 horas e tratadas com diferentes concentrações não tóxicas do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum*. O tratamento convencional, a partir da combinação de SDZ + PIR, controla a proliferação intracelular do parasito. Observou-se, ademais, que o extrato se mostrou efetivo no controle da proliferação intracelular do parasito, com destaque para as concentrações de 40, 60 e 100 µg/mL, quando comparado ao grupo controle (100% de proliferação; grupo não tratado). Em concordância com este trabalho, alguns estudos demonstram que extratos diversos de *P. granatum* apresentam efeitos contra a atividade de alguns patógenos. Um estudo recente mostrou que o extrato polifenólico da casca de *P. granatum*, administrado em células infectadas por trofozoítos de *Giardia lamblia*, inibiu o crescimento proliferativo do protozoário por comprometer sua capacidade de adesão, a qual é fundamental para a patogênese e, por consequência, para a proliferação parasitária. (PALOMO-LIGAS *et al.*, 2022). Similarmente, Tan e colaboradores (2020) demonstraram que a uritolina-A, metabólito produzido no intestino a partir do consumo de elagitaninos, os quais são muito presentes na romã (*P. granatum*), possui efeitos neuroprotetores e anti-neurotoxoplasmose *in vitro* e *in vivo*, colaborando tanto para a diminuição de cistos cerebrais em camundongos infectados, quanto para a melhoria de sua percepção de risco, a qual é comprometida pela neurotoxoplasmose.

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório de ampla distribuição geográfica, com destaque para sua capacidade de infectar uma grande variedade de células nucleadas (DUBEY *et al.*, 2008). Para que o estabelecimento da infecção seja

bem-sucedido, são necessárias uma boa adesão, invasão e proliferação do parasito na célula hospedeira (HALL *et al.*, 2011; ADEYEMI *et al.*, 2017). Para verificar a ação direta do tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. granatum* em taquizoítos de *T. gondii*, foram realizados os ensaios de invasão e proliferação. Deste modo, os taquizoítos foram pré-tratados por 1 hora com o extrato hidroalcoólico e, em seguida, foram incubados com células HTR-8/SVneo. Os resultados demonstram que o pré-tratamento com o extrato de *P. granatum* comprometeu a capacidade dos taquizoítos invadirem e proliferarem em células HTR-8/SVneo. O pré-tratamento com o tratamento convencional (SDZ + PIR; 100 + 4 µg/mL), entretanto, não controlou a invasão, induzindo, inclusive, seu aumento. Para a proliferação, entretanto, foram eficazes em seu controle. Assim, a abordagem experimental de pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* sugerem que este composto pode afetar diretamente a estrutura do parasito e, conseqüentemente, diminuir sua capacidade funcional.

Para testar esta hipótese, avaliando o impacto do pré-tratamento com extrato hidroalcoólico de *P. granatum* em *T. gondii*, taquizoítos incubados por 1 hora com o tratamento e foram observados em microscópio eletrônico de varredura, e foi constatado que o composto induziu alterações morfológicas no corpo do parasito, como reentrâncias na membrana, afinamento do corpo, estruturas em forma de orifício e secreção de vesículas, o que pode explicar sua dificuldade em invadir e proliferar dentro da célula (HARRIS; LEVINE, 2006; PORTES *et al.*, 2012; SCHWAB *et al.*, 2015; YU; TKACH; THÉRY, 2016; SILVA *et al.*, 2018). O pré-tratamento com compostos naturais para *T. gondii*, especialmente com plantas nativas orientais, é responsável por induzir estas alterações funcionais, como bem descrito por Elazab e Arafa (2022), impedindo o parasito de estabelecer a infecção.

Um estudo realizado por Chen e colaboradores (2012), concluiu que o suco de romã reduz o estresse oxidativo placentário *in vivo* e *in vitro*, limitando a morte induzida por estímulo de trofoblastos humanos em cultura, demonstrando que a punicalagina, um importante composto anti-inflamatório e antioxidante encontrado nas romãs, mimetiza esse efeito protetor, além de sugerir que a ingestão antenatal de *P. granatum* pode limitar a lesão placentária e, assim, conferir maior proteção ao feto contra diversos problemas gestacionais, dentre eles, a infecção por patógenos. Outro estudo, também feito por Chen e colaboradores (2016), demonstrou que a punicalagina aprimora a diferenciação dos trofoblastos e sugere que pode ser usada

terapeuticamente em gestações com risco de disfunção placentária. Além disso, outros estudos acima discutidos demonstram o potencial de *Punica granatum* contra a proliferação de células tumorais, além do controle de infecções por outros patógenos. Estes resultados foram somados ao presente estudo, o qual explora estes potenciais de *P. granatum* frente aos estágios iniciais e tardios da infecção congênita por *T. gondii*, os quais ainda não foram descritos na literatura. Os resultados demonstram os efeitos de controle da invasão, proliferação e reversibilidade do parasito. Assim, este estudo ainda sugere que o extrato hidroalcoólico de *P. granatum* é um composto promissor no tratamento contra toxoplasmose congênita, uma vez que é fonte de importantes moléculas bioativas; entretanto, mais estudos precisam ser realizados para investigar e compreender a atuação dessas substâncias que possam ser responsáveis pelas atividades anti-*Toxoplasma* observadas no presente trabalho.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, nós concluímos que o extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *Punica granatum*, em concentrações não-tóxicas, altera a morfologia dos taquizoítos, mostrando eficácia no controle da invasão e da proliferação de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas extravilosas (HTR-8/SVneo). Ademais, duas concentrações do tratamento apresentaram um impacto irreversível na proliferação do parasito, destacando-se como uma possível estratégia terapêutica alternativa para uma possível toxoplasmose congênita. No entanto, são necessários estudos mais profundos para, entre outros aspectos, investigar as alterações ultraestruturais no parasito, bem como avaliar os componentes bioativos do extrato, além da realização de experimentos em modelos *ex vivo*, como em vilos placentários, além de dosagem de citocinas através do método de ELISA, ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS), microscopia eletrônica de transmissão, entre outros.

8. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, S. H. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry (Tehran, Iran)**, v. 8, n. 1, p. 1, 2011.

AHMADPOUR, E. *et al.* Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using automated chemiluminescence and quantitative real time PCR. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 12, n. 1, p. 26-31, 2019.

ALI, S. I. *et al.* HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). **Int J Pharm Clin Res**, v. 6, n. 4, p. 348-355, 2014.

AL-MALKI, E. S. 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.

ALNOMASY, S. F. In vitro and in vivo anti-toxoplasma effects of *Allium sativum* essential oil against *Toxoplasma gondii* RH strain. **Infection and Drug Resistance**, p. 5057-5068, 2021.

ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Science immunology**, v. 4, n. 31, p. eaat6114, 2019.

ANDERSON, A. C. Targeting DHFR in parasitic protozoa. **Drug discovery today**, v. 10, n. 2, p. 121-128, 2005.

BARBOSA, B. F. *et al.* BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 151, n. 3, p. 536-545, 2008.

BARBOSA, B. F. *et al.* Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152-162, 2014.

BARBOSA, B. F. *et al.* Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. **Veterinary parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 44-52, 2012.

BENIRSCHKE, K. *et al.* Early development of the human placenta. **Pathology of the human placenta**, p. 41-53, 2012.

BIALONSKA, D. *et al.* The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 175-182, 2010.

BIGNA, J. J. *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.

BLADER, I. J. *et al.* Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 463-485, 2015.

BLASZKOWSKA, J.; GÓRALSKA, K. Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development. **Annals of parasitology**, v. 60, n. 4, 2014.

BLUME, M. *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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Atenção ao pré-natal de baixo risco. Cadernos de Atenção Básica, n° 32. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**. 2013.

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

CASTRO-FILICE, L. S. *et al.* Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, p. 1-12, 2014.

CARELLOS, E. V. M. *et al.* Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease?. **Epidemiology & Infection**, v. 142, n. 3, p. 644-655, 2014.

CARLIER Y., TRUYENS, C., DELORON, P. *et al.* Congenital Parasitic Infections: A Review. **Acta Tropica**, vol. 121, no. 2, pp. 55–70, 2012.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta tropica**, v. 81, n. 2, p. 111-122, 2002.

CHEN, B. *et al.* Pomegranate juice and punicalagin attenuate oxidative stress and apoptosis in human placenta and in human placental trophoblasts. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 9, p. E1142-E1152, 2012.

CHEN, B. *et al.* Punicalagin promotes human villous trophoblast differentiation. **Placenta**, v. 44, p. 80-82, 2016.

CORRÊA, R. R. M. *et al.* Alterações anatomopatológicas da placenta e variações do índice de Apgar. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, p. 239-243, 2006.

COSTA, I. N. *et al.* Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, v. 30, n. 10, p. 884-890, 2009.

COSTA, I. N. *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.

DE ARAUJO PORTES, J. *et al.* A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **Veterinary parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 261-269, 2012.

DE CASTRO, Luis Antônio Suita. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. Pelotas. **Embrapa**, 2002.

DE LIMA, J. F.; LOPES, K. P.; RIBEIRO, W. S. Classificação botânica e cultivares. **A Cultura da Romãzeira**, p. 2, 2021.

DE MOURA, D. S.; OLIVEIRA, R. C. M.; MATOS-ROCHA, T. J. Toxoplasmose gestacional: perfil epidemiológico e conhecimentos das gestantes atendidas na unidade básica de saúde de um município alagoano. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, p. 69-76, 2018.

DE SOUZA, G. AG. *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.

DE SOUZA, G. *et al.* Cyclooxygenase (COX)-2 modulates *Toxoplasma gondii* infection, immune response and lipid droplets formation in human trophoblast cells and villous explants. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2021.

DE SOUZA, W. *et al.* Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 22, 2010.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I. ; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. **EdiPUCRS**, 2007.

DELABRANCHE, X. *et al.* Microparticles and infectious diseases. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 42, n. 8, p. 335-343, 2012.

DIKMEN, M.; OZTURK, N.; OZTURK, Y. The antioxidant potency of *Punica granatum* L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1638-1646, 2011.

DOLIWA, C. *et al.* Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression or polymorphisms in genes of therapeutic targets and ABC transporters. **Parasite**, v. 20, 2013.

DUBEY, J. P. *et al.* Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. **Parasitology**. v. 141, p. 311-225, 2014.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. v. 139, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009.

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

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

EGHBALI, S. *et al.* Therapeutic effects of *Punica granatum* (pomegranate): an updated review of clinical trials. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2021, 2021.

ELAZAB, S. T.; ARAFA, F. M. Anti-*Toxoplasma* Activities of Some Egyptian Plant Extracts: An In Vitro Study. **Acta Parasitologica**, v. 67, n. 4, p. 1800-1806, 2022.

EL-DEMERDASH, F. M.; AHMED, M. M.; BAGHDADI, H. H. *Punica granatum* peel extract modulates levofloxacin-induced oxidative stress and testicular damage in rats. **Tissue and Cell**, v. 85, p. 102227, 2023.

ELTAYSH, R. *et al.* Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Inhibits the *In Vitro* and *In Vivo* Growth of Piroplasm Parasites. **Journal of Parasitology Research**, v. 2022, 2022.

FALLAHI, S. *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, p. 133-140, 2018.

FIRMO, W. C. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, p. 90-95. 2012.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and

differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/ MS. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807-821. 2011.

FITZGERALD, J. S. *et al.* Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Human reproduction update**, v. 14, n. 4, p. 335-344, 2008.

GOLDSTEIN, E. JC; MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical infectious diseases**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.

GRAHAM, C. H. *et al.* Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. **Experimental cell research**, v. 206, n. 2, p. 204-211, 1993.

HARLAN, J. R. *et al.* **Crops and man**. American Society of Agronomy, 1992.

HOO, R.; NAKIMULI, A.; VENTO-TORMO, R. Innate immune mechanisms to protect against infection at the human decidual-placental interface. **Frontiers in immunology**, p. 2070, 2020.

JEFFERS, Victoria *et al.* A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, p. 2355-2373, 2018.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M. Congenital toxoplasmosis. **American family physician**, v. 67, n. 10, p. 2131-2138, 2003.

JONES, J. L. *et al.* Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001.

KETA, O. D. *et al.* Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract: potential cytotoxic agent against different cancer cell lines. **Records of Natural Products**, v. 14, n. 5, p. 326-339, 2020.

KIEFFER, F.; WALLON, M. Congenital toxoplasmosis. **Handbook of clinical neurology**, v. 112, p. 1099-1101, 2013.

LANNES-VIEIRA, J.; SOUZA, W.; BELFORT, J. R. Resposta Imune na Infecção por *Toxoplasma gondii*: desafios e oportunidades. **Souza W, and Belfort JR Toxoplasmosose & Toxoplasma gondii**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 83-98, 2014.

LEESOMBUN, A.; BOONMASAWAI, S.; NISHIKAWA, Y. Ethanol extracts from Thai plants have anti-*plasmodium* and anti-*toxoplasma* activities in vitro. **Acta parasitologica**, v. 64, p. 257-261, 2019.

LIEMPI, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? **Placenta**, London, v. 35, n. 12, p. 1035- 1042, dez. 2014.

LIMA, J. A. S. **Comparação da prevalência de parasitos entéricos em gatos errantes e domiciliados em goiânia-goiás, análise da acurácia de técnicas parasitológicas e avaliação da COPRO-PCR para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii*.** 2016. 83p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016. Disponível em <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/9911>> acesso em 26.06.2023

LIN, Liang-Tzung *et al.* Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2013.

LUZ, L. C. **O tratamento com óleo resina de copaifera multijuga em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) infectadas por *Toxoplasma gondii* reduz o parasitismo.** 2020. 50p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. Disponível em <[https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/32001/1/Tratamento%> Acesso em 26.06.2023](https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/32001/1/Tratamento%c3%93leoResina.pdf)

MAGNO, R. C. *et al.* **Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole.** *Microscopy research and technique*, v. 67, n. 1, p. 45-52, 2005.

MAHMOOD, M. S. *et al.* Portrayal of *Punica granatum* L. peel extract through High Performance Liquid Chromatography and antimicrobial activity evaluation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

MALASSINÉ, A.; FRENDO, J.-L.; EVAÏN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Human reproduction update**, v. 9, n. 6, p. 531-539, 2003.

MARGONATO, F. B. *et al.* Toxoplasmose na gestação: diagnóstico, tratamento e importância de protocolo clínico. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, p. 381-386, 2007.

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

MARTÍNEZ, A. F. F. *et al.* Leaf hydroalcoholic extract and oleoresin from *Copaifera multijuga* control *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and placental explants from third-trimester pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 109, 2023.

MEHRABANI, M. *et al.* Evaluation of the Cytotoxicity, Antibacterial, Antioxidant, and Anti-inflammatory Effects of Different Extracts of *Punica granatum* var. pleniflora. **Journal of Kerman University of Medical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 414-425, 2020.

MELGAREJO, P.; MARTÍNEZ, R. El granado. **Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, Spain**, p. 163, 1992.

MIDGLEY, A. R. *et al.* Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science*, v. 141, n. 3578, p. 349-350. 1963.

MILLER, R. *et al.*, Bilateral retinochoroiditis caused by an atypical strain of *Toxoplasma gondii*. **The British Journal of Ophthalmology**. London, v. 93, n. 11, p. 1546-50, 2009.

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

MODAEINAMA, S. *et al.* Anti tumoral properties of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on different human cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 14, p. 5697-5701, 2015.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

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

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

MONTOYA, J.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis Lancet 363, 1965–1976. **CrossRef| PubMed| CAS| Web of Science Times Cited**, v. 807, 2004.

MORADI, M. T. *et al.* Anti-influenza virus activity and phenolic content of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract and fractions. **Avicenna journal of medical biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 285, 2019.

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

MSD Manuals. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Disponível em: <msdmanuals.com>. Acesso em: 28 nov. 2023.

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

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 13a edição. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 2016.

OZ, H. S. Novel synergistic protective efficacy of atovaquone and diclazuril on fetal-maternal toxoplasmosis. **International journal of clinical medicine**, v. 5, n. 15, p. 921, 2014.

PALOMO-LIGAS, L. *et al.* Polyphenolic extract from *Punica granatum* peel causes cytoskeleton-related damage on *Giardia lamblia* trophozoites in vitro. **PeerJ**, v. 10, p. e13350, 2022.

PEREIRA, A. C. A. *et al.* Cyclooxygenase (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**, v. 10, p. 225, 2019.

PEYRON, F. *et al.* Congenital toxoplasmosis in France and the United States: one parasite, two diverging approaches. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, 2017.

PEYRON, F. *et al.* Maternal and congenital toxoplasmosis: diagnosis and treatment recommendations of a French multidisciplinary working group. **Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 24, 2019.

POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. **Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)**, v. 162, n. 9-10, p. 187-190, 2012.

RATES, Stela Maria Kuze. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REMINGTON, J. S. *et al.* Infectious diseases of the fetus and newborn E-book. **Elsevier Health Sciences**, 2010.

RIBEIRO, M. *et al.* Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. **Experimental parasitology**, v. 181, p. 111-118, 2017.

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

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

ROCHA, T. O. *et al.* Os efeitos da *Punica granatum* L. em diferentes concentrações sobre duas linhagens celulares: estudo in vitro. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 49, 2020.

RODRIGUES, N. J. L. *et al.* Atualizações e padrões da toxoplasmose humana e animal: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 1-15, 2022.

ROMERO, D. A. *et al.* Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la toxoplasmosis en mujeres en edad reproductiva que acudieron al Hospital Distrital de Lambaré, Paraguay. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 15, n. 3, p. 83-88, 2017.

SALLES, T. S. *et al.* Virucidal and antiviral activities of pomegranate (*Punica granatum*) extract against the mosquito-borne *Mayaro virus*. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2021.

SANTIAGO, M. C. P. A. de A. *et al.* Determinação de Punicalagina em Romã (*Punica granatum* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência. Comunicado Técnico 204, **Embrapa**, Rio de Janeiro, 2014.

SCHWAB, A. *et al.* Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1132, 2015.

SERRANTI, D.; BUONSENSO, D; VALENTINI, P. Congenital toxoplasmosis treatment. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 2, 2011.

SHARIF, M. *et al.* The efficacy of herbal medicines against *Toxoplasma gondii* during the last 3 decades: a systematic review. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 94, n. 12, p. 1237-1248, 2016.

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

SILVA, V. O. *et al.* Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 9, p. e12571, 2018.

SIMMONDS, N. W. Evolution of crop plants. **(No Title)**, 1976.

SINEH SEPEHR, K. *et al.* Studies on the cytotoxic activities of *Punica granatum* L. var. spinosa (apple punice) extract on prostate cell line by induction of apoptosis. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

SINGH, J. *et al.* Pomegranate Peel Phytochemistry, Pharmacological Properties, Methods

of Extraction, and Its Application: A Comprehensive Review. **ACS omega**, v. 8, n. 39, p. 35452-35469, 2023.

TAN, S.; TONG, W. H.; VYAS, A. Urolithin-A attenuates neurotoxoplasmosis and alters innate response towards predator odor. **Brain, Behavior, & Immunity-Health**, v. 8, p. 100128, 2020.

TEIMOURI, A. *et al.* Role of *Toxoplasma gondii* IgG Avidity Testing in Discriminating between Acute and Chronic Toxoplasmosis in Pregnancy. **J Clin Microbiol.** v. 24;58(9). 2020.

TEIXEIRA, S. C. *et al.* *Copaifera* spp. oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-24, 2020.

TEIXEIRA, S. C. *et al.* Polyalthic acid and oleoresin from *Copaifera trapezifolia* Hayne reduce *Toxoplasma gondii* growth in human villous explants, even triggering an anti-inflammatory profile. **Experimental Parasitology**, v. 250, p. 108534, 2023.

TEIXEIRA, S. C. *et al.* Rottlerin impairs early and late steps of *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and villous explants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 384, p. 110716, 2023.

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

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TEO, C. F. *et al.* Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 679-688, 2007.

TKACH, M; THÉRY, C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1226-1232, 2016.

TONG, W. H. *et al.* Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. **Parasites & Vectors**, v. 14, p. 1-6, 2021.

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

TORQUATO, J. V. M. B. *et al.* Toxoplasmose e gestação: revisão de literatura

Toxoplasmosis and pregnancy: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 35265-35272, 2022.

TRAVERS, H.; SCHMIDT, W. A. College of American Pathologists Conference XIX on the Examination of the Placenta: introduction. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 115, n. 7, p. 660-661, 1991.

VALENTINI, P. *et al.* Spiramycin/cotrimoxazole versus pyrimethamine/sulfonamide and spiramycin alone for the treatment of toxoplasmosis in pregnancy. **Journal of Perinatology**, v. 35, n. 2, p. 90-94, 2015.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, jun. 2005.

VENUSOVA, E. *et al.* Physiological and immune functions of punicalagin. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2150, 2021.

VIJAYALAXMI, K. K.; VISHALAKSHI, M. Evaluation of the genotoxic effects of pyrimethamine, an antimalarial drug, in the *in vivo* mouse. **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, v. 20, n. 2, p. 65-71, 2000.

WHARTON, J. *et al.* Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 687-691, 1993.

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

YU, X.; HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. **Cancer research**, v. 66, n. 9, p. 4795-4801, 2006.

9. 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