



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANGÉLICA PAULINA NUNES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E  
METABÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare* L.) EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS  
BeWo INFECTADAS COM A CEPA RH DE *Toxoplasma  
gondii***

---

Londrina  
2022

ANGÉLICA PAULINA NUNES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E  
METABÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare* L.) EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS  
BeWo INFECTADAS COM A CEPA RH DE *Toxoplasma  
gondii***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Idessania Nazareth Costa

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de  
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Nunes, Angélica Paulina .

Avaliação da atividade antiproliferativa e metabólica do óleo essencial de  
orégano (*Origanum vulgare* L.) em células trofoblásticas BeWo infectadas com  
a cepa RH de *Toxoplasma gondii* / Angélica Paulina Nunes. - Londrina, 2022.  
69 f. : il.

Orientador: Idessania Nazareth Costa.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Experimental, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose - Tese. 2. Tratamento alternativo - Tese. 3. *Origanum  
vulgare* - Tese. I. Costa, Idessania Nazareth . II. Universidade Estadual de  
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

ANGÉLICA PAULINA NUNES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E  
METABÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare* L.) EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS  
BeWo INFECTADAS COM A CEPA RH DE *Toxoplasma  
gondii***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Idessania Nazareth  
Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Larissa Rodrigues Bosqui  
Centro Universitário Filadélfia de Londrina -  
UNIFIL

Londrina, 19 de abril de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos meus pais, por sonharem os meus sonhos sem nunca desistirem de investir tempo e esforço na minha formação. Foi árduo tudo o que passamos, toda a distância e saudade, porém conseguimos mais esta etapa. Meu mais sincero obrigada!

Aos meus irmãos Gustavo dos Santos Nunes, Ana Caroline Nunes, Guilherme Provezi e Radamés Nunes, por estarem comigo e se fazerem presentes mesmo longe. Dedico este trabalho a minha avó Francisca Reis dos Santos e em memória ao meu avô Alcides Acendino dos Santos, que batalharam para que nossa família prosperasse. Vó, saibas que tudo o que sou dedico a você.

Minha gratidão ao meu parceiro de vida Fabio, que mesmo com toda a distância enfrentada sempre se fez presente em minha vida todos os dias. Me ouvindo chorar, vendo Star Trek pra acalmar e rindo das peripécias da vida. Até dedos seus tem neste trabalho, domingo à noite formatando. Obrigada.

Não posso deixar de agradecer a minha psicóloga Beatriz Milharini, que trilhou este caminho comigo, me ouvindo com paciência e guiando com nossas reflexões. Conviver com o transtorno de ansiedade generalizada não é fácil, porém você sabiamente ajudou com o tratamento.

Agradeço com todo meu coração a oportunidade que minha orientadora e mãe científica, professora Dra. Idessania Nazareth Costa, me proporcionou. Por acreditar em minha capacidade ao aceitar esta orientação, em todos os momentos de dificuldade e em meio a uma pandemia, esforçou-se para me ajudar em meu crescimento acadêmico, sempre com muita paciência e compreensão. Mais que uma orientação, o que fica em mim são frutos de uma amizade.

Agradeço aos professores doutores Wander Rogério Pavanelli, Ivete Conchon-Costa, Danielle Lazarin-Bidóia e Larissa Bosqui, por todos os ensinamentos, parceria e amor à parasitologia. Professor Wander meu padrasto científico que abriu portas e me guiou neste processo.

Não há palavras que definam a gratidão que tenho a família LIDNC, todos os amigos que ganhei em Londrina cativaram meu coração de alguma forma. Meus grandes amigos Taylon Felipe Silva e Virgínia M. Concato que me ensinaram desde a calibrar pipeta até plotar dados, que com muita paciência e risadas me auxiliaram a dar luz a este trabalho. À Raquel Arruda Sanfelice, que me apresentou todas as

técnicas que precisava aprender. À Mariana B. Detoni e Ana Carolina Jacob com muito afeto ouviram meus choros e também risos, e me levantaram quando eu não tinha forças. Saibam as duas que o acolhimento de vocês foi minha salvação. Amanda Cristina M. Carloto, Ellen M. de Souza, Juliana M. Bittencourt, Elaine da Silva Siqueira, Fabricio Innoue, Fernanda Tomiotto-Pellissier, Bruna T. da Silva Bortoleti, que estiveram comigo nesta caminhada.

Minha gêmea de pesquisa Yasmin Munhoz dos Santos, que se tornou desde que nos conhecemos uma grande parceira de vida. Tu estás em todos os momentos segurando minha mão e me ajudando, como uma verdadeira irmã. Sou extremamente grata por toda ajuda, perrengues e amizade acima de tudo.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho ser realizado. Principalmente ao setor de veterinária da UEL que prontamente me cederam parasitos, Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio ao modelo experimental e ao ceder a linhagem BeWo, além da professora doutora Renata Katsuko Takayama Kobayashi da microbiologia que cedeu o óleo essencial de orégano.

Não menos importante, devo agradecer ao PPG Patologia Experimental, por me possibilitar cursar o mestrado com bolsa, e aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

## RESUMO

NUNES, Angélica Paulina. **Avaliação da atividade antiproliferativa e metabólica do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em células trofoblásticas BeWo infectadas com a cepa RH de *Toxoplasma gondii***. 2021. 66 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Possui importância na saúde pública principalmente por promover, muitas vezes, quadros graves na infecção congênita. O tratamento atual limita-se ao uso de espiramicina ou associação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico. Os efeitos tóxicos causados pelos fármacos, levam à necessidade de novas estratégias terapêuticas. Assim, o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) (OEO) apresenta-se como uma alternativa promissora devido ao seu potencial antibacteriano, antifúngico e antiparasitário. O objetivo deste trabalho foi analisar a capacidade antiproliferativa e mecanismos de ação diretos do OEO em taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH). Para investigar a toxicidade do OEO em células BeWo foi realizado o ensaio de MTT utilizando concentrações de 0,7 a 150 µg/mL. Para avaliar a viabilidade de taquizoítos após tratamento com OEO utilizou-se método de exclusão por azul de tripan. Em seguida, foram calculados a concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>), inibitória (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS). A atividade antiproliferativa do tratamento com OEO foi determinada pelos índices de infecção e proliferação intracelular do parasito tratados com OEO utilizando concentrações 6,2; 12; 25 e 50 µg/mL e confirmados pela microscopia de luz por meio da coloração de azul de toluidina. Os mecanismos envolvidos na morte direta do parasito também foram avaliados, sendo eles, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), potencial de membrana mitocondrial e gotículas lipídicas. A apoptose e a permeabilização da membrana plasmática foram investigados por citometria de fluxo através da marcação com Anexina-V e iodeto de propídio, além de autofagia por monodansilcadaverina. Para avaliar topologia (SEM) e ultraestrutura (TEM) foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. O tratamento com OEO apresentou baixa citotoxicidade nas células BeWo (CC<sub>50</sub> de 114,8 µg/mL ± 0,01), redução da viabilidade de taquizoítos (CI<sub>50</sub> de 12,5 ± 0,06 µg/mL), e IS de 9,18. Houve redução da proliferação intracelular de 55% e 84% nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, respectivamente. Em taquizoítos livres, o tratamento causou aumento dos níveis de EROs, despolarização da membrana mitocondrial e formação de gotículas lipídicas, bem como tumefação da mitocôndria observadas em TEM. Estas alterações estão atreladas à indução do processo de autofagia e permeabilização de membrana plasmática, com extravasamento do conteúdo citoplasmático e alterações nucleares, confirmadas através de TEM e SEM, culminando em um processo de morte celular. O tratamento com OEO demonstrou atividade anti-*T. gondii* direcionando a morte do parasito por alterações metabólicas sem causar toxicidade às células, podendo ser um composto promissor no tratamento da toxoplasmose.

**Palavras-chave:** toxoplasmose; tratamento alternativo; *origanum vulgare*.

## ABSTRACT

NUNES, Angélica Paulina. **Evaluation of antiproliferative and metabolic activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) in BeWo trophoblast cells infected with cepa RH of *Toxoplasma gondii*.** 2021. 66 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

Toxoplasmosis is a disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. It has in public health mainly for promoting, sometimes, serious conditions in the public majority. Current treatment is limited to the use of spiramycin or the association of sulfadiazine, pyrimethamine and folinic acid. The effects of medicines lead to the need for new therapies. Thus, the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) (OEO) presents itself as a promising alternative due to its antibacterial, antifungal and antiparasitic potential. The objective of this work was to analyze the antiproliferative capacity and the mechanisms of the direct action of OEO in tachyzoites of *T. gondii* (RH strain). To investigate the toxicity of OEO in BeWo cells, the MTT assay was performed using concentrations from 0.7 to 150 µg/mL. To evaluate the viability of tachyzoites after treatment with OEO, the trypan blue exclusion method was used. Then, the cytotoxic (CC<sub>50</sub>), inhibitory (IC<sub>50</sub>) and selectivity index (SI) concentrations were calculated. The antiproliferative activity of the OEO treatment was determined by the rates of infection and intracellular proliferation of the parasite treated with OEO using concentrations 6.2; 12; 25 and 50 µg/mL and confirmed by light microscopy using toluidine blue staining. The mechanisms involved in the direct death of the parasite were also evaluated, namely, levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential and lipid droplets. Apoptosis and plasma membrane permeabilization were investigated by flow cytometry by labeling with Annexin-V and propidium iodide, in addition to autophagy by monodansylcadaverine. To evaluate topology (SEM) and ultrastructure (TEM) scanning and transmission electron microscopy analyzes were performed. OEO treatment showed low cytotoxicity on BeWo cells (CC<sub>50</sub> of 114.8 µg/mL ± 0.01), reduced tachyzoite viability (IC<sub>50</sub> of 12.5 ± 0.06 µg/mL), and IS of 9. 18. There was a reduction in intracellular proliferation of 55% and 84% at concentrations of 25 and 50 µg/mL, respectively. In free tachyzoites, treatment caused increased levels of ROS, mitochondrial membrane depolarization and lipid droplet formation, as well as mitochondrial swelling seen in TEM. These alterations are linked to the induction of the process of autophagy and permeabilization of the plasma membrane, with extravasation of the cytoplasmic content and nuclear alterations, confirmed by TEM and SEM, culminating in a process of cell death. OEO treatment demonstrated anti-*Toxoplasma* directing the death of the parasite by metabolic changes without causing toxicity to the cells, which may be a promising compound in the treatment of toxoplasmosis.

**Key words:** toxoplasmosis; alternative treatment; *origanum vulgare*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Imagem representativa ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* .....14

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
AN	Anexina V
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
Abs	Absorbância
CDC	Do inglês, Centro de controle e prevenção de doenças
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica média
DHPS	Dihidropteroato sintase
DHFR	Dihidrofolato redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
IgG	Imunoglobulina G
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgE	Imunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF- $\gamma$	Interferon gamma
IS	Índice de Seletividade
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
MyD88	Gene de resposta primária de diferenciação mieloide (88)

NF-kB	Fator nuclear kappa B
NK	Natural killer
OEO	Óleo essencial de orégano
PBS	Tampão fosfato-salino
PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PRR	Receptores de padrões associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
RNA	Ácido ribonucleico
SDZ+PYR	Sulfadiazina + pirimetamina
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
Th1	Linfócitos T auxiliar 1
Th2	Linfócitos T auxiliar 2
Th17	Linfócitos T auxiliar 17
TLR2	Receptor tipo Toll 2
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TLR11	Receptor tipo Toll 11
TLR12	Receptor tipo Toll 12
TMRE	Éster etílico de tetrametilrodamina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócitos T reguladores

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
1.1	ASPECTOS MORFO-BIOLÓGICOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	11
1.2	CEPAS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	14
1.3	EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE .....	15
1.4	IMUNOPATOGENIA DA TOXOPLASMOSE E TOXOPLASMOSE GESTACIONAL .....	17
1.5	CÉLULAS BEWo .....	20
1.6	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE .....	21
1.6.1	Óleo Essencial de Orégano.....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
	OBJETIVO GERAL .....	25
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	38
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	66

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 ASPECTOS MORFO-BIOLÓGICOS DE *TOXOPLASMA GONDII*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório e agente etiológico da toxoplasmose, possui capacidade de infectar qualquer célula nucleada de aves e mamíferos, sendo a doença considerada uma zoonose de distribuição mundial (PAREDES-SANTOS *et al.*, 2012; FENOY *et al.*, 2016; MOTA *et al.*, 2017).

*T. gondii* está classificado no Filo Protozoa, Subfilo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae e gênero *Toxoplasma*. Este parasito foi descrito por Splendore e Nicole Manceaux em 1908 no Brasil e na Tunísia respectivamente (SMITH *et al.*, 2020) *T. gondii* é a única espécie do gênero *Toxoplasma* (SOKOL-BORRELLI *et al.*, 2020).

A estrutura morfológica é alongada, com formato curvilíneo (REMINGTON *et al.*, 2016). Possui única mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomos e núcleo localizado na região central ou próximo da extremidade posterior. O sistema de membranas é caracterizado por uma membrana externa simples e contínua, além de uma interna dupla com duas membranas unitárias acopladas (DUBEY *et al.*, 1998; ATTIAS *et al.*, 2020).

Apresentam na região anterior o complexo apical, composto por conóide, anéis polares, micronemas, roptrias e grânulos densos. Primeiramente, o conóide é uma estrutura móvel, que se desloca acima e abaixo do anel polar posterior. Abaixo, os anéis polares fazem parte uma rede de microtúbulos que se dispõem em formato espiral formando citoesqueleto em direção a região posterior (DUBEY *et al.*, 1998; HU *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2010; MORRISSETTE *et al.*, 2015).

Micronemas são estruturas localizadas na região apical, secretoras de moléculas adesivas e estão relacionadas ao processo de adesão, motilidade e invasão (SOLDATI *et al.*, 2001; JIMENEZ-RUIZ *et al.*, 2016; ALI-HAKIMI *et al.*, 2017; ATTIAS *et al.*, 2020). Já as roptrias possuem ação na internalização do parasito na célula hospedeira, de maneira que o conteúdo proteico é liberado durante a invasão, digerindo a membrana plasmática da célula alvo além de relacionar-se com a formação do vacúolo parasitóforo (ALI-HAKIMI *et al.*, 2017; SUAREZ *et al.*, 2021). Os grânulos densos estão distribuídos no citoplasma e agem

liberando glicoproteínas no vacúolo parasitóforo permitindo a evasão do parasito às respostas imunológicas do hospedeiro (CORTEZ *et al.*, 2005, ALI-HAKIMI *et al.*, 2017; ZHANG 2019).

Desta forma, o processo de infecção é iniciado com o reconhecimento da célula alvo, que é favorecida por antígenos e proteínas de superfície que recobre os taquizoítos e permitem sua ancoragem. Seguido pela etapa de adesão, onde a região apical do parasito liga-se a membrana plasmática através de proteínas adesivas secretadas pelos micronemas. Para invadir a célula hospedeira, taquizoítos poderão ser fagocitados ou ainda iniciar um movimento dependente de actina chamado *gliding*. Auxiliando a invasão, roptrias iniciam a liberação de enzimas proteolíticas e também atuam no estabelecimento do vacúolo parasitóforo (OPITZ e SOLDATI 2002; SINAI 2008; KATO 2018; ZHU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; BARROS 2020).

Durante o ciclo existem três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e oocitos. Taquizoítos apresentam forma de lua crescente, com a extremidade posterior arredondada e anterior afilada. A reprodução é assexuada por endodiogenia, sendo a forma de disseminação rápida nos tecidos, respectivo à fase aguda da toxoplasmose (MONTROYA e LIESENFELD 2004; LIU *et al.*, 2019). Quando estão abrigados no interior do vacúolo parasitóforo, utilizam diversos nutrientes da célula hospedeira (BLADER & SAEJI 2009; BLADER *et al.*, 2015; LÜDER & RAHMAN, 2017; ATTIAS *et al.*, 2020).

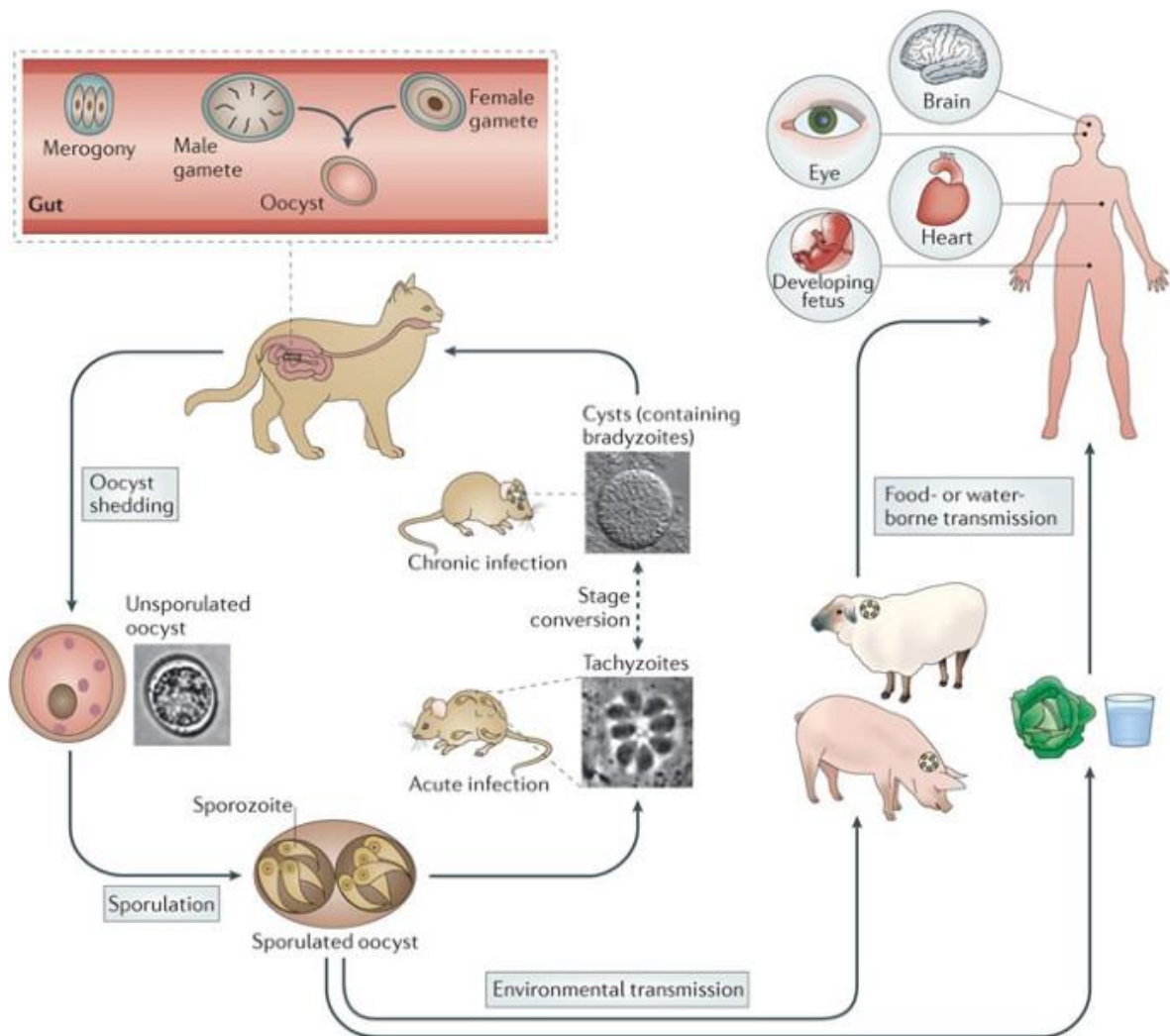
Após ação da resposta imune hospedeira, taquizoítos são diferenciados em bradizoítos. Estes são envoltos em parede espessa que se desenvolve sob a membrana do vacúolo parasitóforo (TU *et al.*, 2019). Bradizoítos possuem resistência à ação de enzimas proteolíticas, bem como proteção ao sistema imune hospedeiro, favorecendo sua permanência tecidual (BLADER & SAEIJ 2009; ROBERT-GANGNEUX 2014). A replicação é lenta e caracteriza a fase crônica da doença. (TOMITA *et al.*, 2017; SUGI *et al.*, 2017; TU *et al.*, 2019; ATTIAS *et al.*, 2020). Os oocistos possuem superfície elíptica quando não esporulados, medindo 8 µm de comprimento por 2 µm de largura. A superfície é hidrofílica, pouco adesiva, permitindo que se mova em solos após chuva ou em água doce (SHAPIRO *et al.*, 2009; DUMETRE *et al.*, 2012, DUMETRE *et al.*, 2013). Possuem origem a partir da reprodução sexuada em felídeos. Em forma imatura, os oocistos possuem em seu

interior um esporoblasto no processo de esporulação, divididos em dois esporocistos. Ao atingirem o final do processo de maturação são originados quatro esporozoítos dentro de dois esporocistos (DUBEY *et al.*, 1998; ATTIAS *et al.*, 2020).

O ciclo de *T. gondii* é heteroxeno facultativo e intracelular obrigatório, capaz de infectar animais vertebrados. Apenas felídeos (gêneros *Felis* e *Lynx*) são hospedeiros definitivos onde ocorre a reprodução sexuada (YAN *et al.*, 2016; ATTIAS *et al.*, 2020). O ciclo sexuada inicia-se quando felinos ingerem formas infectantes que ao chegar no estômago, a ação do pH e enzimas proteolíticas favorecem o rompimento da parede de oocistos/cistos, liberando esporozoítos e bradizoítos, que migram para o epitélio intestinal e infectam enterócitos (ATTIAS *et al.*, 2020).

Após infecção de enterócitos por merozoítos e sucessivas divisões por merogonia, ocorre a lise da célula infectada e liberação de merozoítos, que penetram em novas células intestinais e diferenciam-se em formas sexuadas femininas e masculinas (YAN *et al.*, 2016; ATTIAS *et al.*, 2020). Macrogametas femininos são imóveis e microgametas masculinos móveis, desta forma, os microgametas saem das células e fecundam os macrogametas presentes em células vizinhas. Como consequência, o processo de fertilização é iniciado, levando a formação de oocisto imaturo. Quando expelido junto às fezes, sob condições ideais de temperatura e umidade tornam-se infectantes (YAN *et al.*, 2016; ATTIAS *et al.*, 2020).

O ciclo assexuado ocorre em aves e mamíferos, incluindo o homem, considerados hospedeiros intermediários. O início do ciclo biológico acontece através da passagem de taquizoítos pelo aleitamento materno, transfusão de sangue ou transmissão vertical, bradizoítos através de carne crua ou mal passada, transplante de órgãos infectados ou ainda oocistos em ambiente, como hortaliças, água ou terra. Brevemente, taquizoítos penetram enterócitos onde após sucessivas divisões (5-6) rompem a membrana da célula hospedeira e são liberados para o meio extracelular, infectando novas células e disseminando através de sangue e linfa para novos sítios de infecção. Uma vez estabelecida a infecção, o sistema imunológico hospedeiro induz diferenciação de taquizoítos para bradizoítos e consequente formação de cistos teciduais (DUBEY 1988; ACHA e SZYFRES 2003; YAN *et al.*, 2016; ROUGIER *et al.*, 2017; ATTIAS *et al.*, 2020).



Nature Reviews | Microbiology

**Figura 1.** Imagem representativa ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Fonte: Hunter; Sibley (2012).

### 1.2 CEPAS DE *TOXOPLASMA GONDII*

Relata-se diferentes genótipos e fenótipos para *T. gondii*, relacionando estes à gravidade e agressividade da toxoplasmose em modelos murinos (HASSAN *et al.*, 2019). Classicamente são organizadas em três principais cepas clonais observadas na Europa e América do Norte sendo elas, tipo I, II e III (SIBLEY *et al.*, 2002).

Cepas clonais do tipo I, como a RH, CAST e VEL, são cepas de alta virulência. Caracterizam-se por rápida divisão intracelular de taquizoítos, além de induzir em modelos murinos robusta produção de citocinas pró inflamatórias, levando à danos teciduais reduzindo a sobrevida do hospedeiro. Em contrapartida,

há menor capacidade de formar cistos *in vitro* (SAEIJ *et al.*, 2005; XIAO e YOLKEN 2016; MONTAZERI *et al.*, 2017; ARMAND *et al.*, 2017). Embora ensaios de seleção de compostos possam ser delineados com diferentes tipos de cepas de *T. gondii*, a cepa tipo RH é frequentemente utilizada para adaptar-se bem à cultura *in vitro* e replica-se de forma rápida e sem grandes taxas de mutações. Esta cepa fornece um modelo de infecção aguda. Contudo, este modelo não é interessante para avaliação da atividade de compostos contra cistos por exemplo, além disto, a cepa tipo I não possui distribuição dominante na maioria das áreas do mundo (ALDAY e DOGGETT 2017).

Cepas clonais do tipo II como ME49, WIL, HART e tipo III como VEG e SOU, são consideradas de moderada e baixa virulências respectivamente. Caracterizam-se por reprodução intracelular baixa e formação de cistos com maior velocidade, característica de quadros crônicos (JOKELAINEN *et al.*, 2018). As cepas do tipo II estão relacionadas à casos de reativação de infecção crônica em humanos e infecções congênitas enquanto que cepas do tipo III associam-se às infecções em animais e imunossuprimidos e são responsáveis por infecções brandas e assintomáticas (FLEGR *et al.*, 2014; ARMAND *et al.*, 2017).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

Dados do Centers for Disease Control and Prevention (CDC 2018) apontam que a infecção por *T. gondii* possui ampla distribuição mundial, sendo em várias regiões os índices de infecção chegam a 60%. Estipula-se que a soroprevalência em humanos esteja distribuída da seguinte forma: a maior taxa no continente da África (61,6%), seguido por Austrália com 38,5%, América do Sul com 31,2%, Europa com 29,7% e as menores taxas na Ásia 16,4% e América do Norte 17,5% (MOLAN *et al.*, 2019; MOUSAVI-HASANZADEH *et al.*, 2020). Estes índices estão relacionados a fatores climáticos, socioeconômicos, culturais, geográficos e relativos aos hábitos alimentares (FIALHO *et al.*, 2009; VAZ *et al.*, 2011; CDC 2018).

A soroprevalência no Brasil foi estudada por Passos e colaboradores (2017) que determinam anticorpos IgM e IgG anti-*Toxoplasma* em uma população humana adulta no estado de São Paulo foi de 62% positivos para IgG e 2,5% foram positivos para IgM, além disto, o risco mostrou-se acumulado com a idade. De Carmo e

colaboradores (2016) que identificaram soroprevalência em área rural no estado do Pará de 81,2% de IgG e IgM 0,70%. Já percentual de mortes por região no Brasil é de 26% no Sudeste e Nordeste, 15% no Sul, 7% e 6% no Centro-oeste e Norte respectivamente (SOUZA *et al.*, 2021). Tomados em conjunto estes índices, relacionam-se à idade, nível sócio cultural e consumo de água não tratada, bem como importância do diagnóstico sorológico para detecção precoce e tratamento dos casos (CASTILHO-PELLOSO *et al.*, 2005; VAZ *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2020).

Especificamente no município de Santa Isabel do Ivaí/PR, há registro do maior surto mundial de toxoplasmose humana, ligado a cisterna de água contaminada, que abastecia a cidade. Ao todo foram encontrados 426 pessoas com anticorpos IgM anti-*T. gondii* positivos, destes, uma alta prevalência de doença sistêmica sintomática, inclusive com comprometimento ocular associado (DE MOURA *et al.*, 2006; VAUDAUX *et al.*, 2010)

No contexto da toxoplasmose gestacional no mundo, aponta-se que a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em mulheres grávidas foi de 45% na África Central, 63% no Chile, 51% na Argentina, 54,8% na Austrália. Sendo os maiores índices em países da América do Sul, Oriente Médio e África (> 50%) e a menor soroprevalência estão em países da Europa e América do Norte (10-30%) (REMINGTON *et al.*, 2001; TORGERSON e MASTROIACOVO 2013; ROSTAMI *et al.*, 2019; ROSTAMI *et al.*, 2020; ADUGNA *et al.*, 2021, MIHU *et al.*, 2022). Associam-se estes dados aos baixos índices de renda per capita, baixas longitudes e latitudes, baixa umidade e altas médias de temperatura anuais (ROSTAMI *et al.*, 2019).

Em gestantes brasileiras a soroprevalência é variável, sendo mulheres em idade fértil de 50 à 80% e gestantes de 36 à 92%, sendo estimado que em torno de 14/1000 gestantes estejam infectadas, representando um montante de 60 mil novos casos anualmente, já a toxoplasmose congênita afeta em torno de 0,2 à 2 por 100 nascimentos no Brasil. Destaca-se, portanto, o Brasil como um dos países com maiores prevalências neste grupo populacional (DUBEY 2012; TABILE *et al.*, 2015). Alguns dos fatores envolvidos na ocorrência persistente de casos de toxoplasmose aguda no Brasil estão relacionados ao encaminhamento tardio aos serviços médicos especializados, manejo inadequado da gestante durante o pré-natal,

seguida pelas vulnerabilidades sociais enfrentadas pelo país (VILLAR *et al.*, 2020).

Além disso, dados do protocolo de notificação e investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita destaca-se que fatores como a cepa do parasito e a imunidade do indivíduo são essenciais para manter os dados de prevalência da infecção elevados. Este problema está atrelado à ausência de diretrizes e protocolos padronizados na vigilância epidemiológica, sendo que as definições de caso, metodologias de exames diagnósticos e orientações ao paciente não possuem padronização nacional, prejudicando assim, o planejamento de ações que se voltem a prevenção e o controle (BRASIL, 2018; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2020).

#### 1.4 IMUNOPATOGENIA DA TOXOPLASMOSE E TOXOPLASMOSE GESTACIONAL

*T. gondii* é considerado um parasito que possui habilidade sofisticada em invadir diferentes tipos celulares e sobrepujar o reconhecimento e a resposta imunológica do hospedeiro, podendo manter-se oculto em forma de cistos por um longo período de tempo (BARROS, 2020). A partir da invasão de enterócitos há início da resposta imune com a liberação de quimiocinas e recrutamento de células como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (SASAI *et al.*, 2018). O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) por receptores de padrões associados a patógenos (PRR), leva a sinalização via MyD88 e em última instância indução de síntese de IL-12. Neste contexto os PAMPS mais conhecidos são glicosilfosfatidilinositol presente na membrana celular de *T. gondii* que se liga à TLR2 e TLR4, levando a síntese de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  e profilina que recobre o parasito, é reconhecida por TLR11 e 12 (RAETZ *et al.*, 2013 FISCH *et al.*, 2019).

O parasito estimula macrófagos e células dendríticas (APCs) a secretar IL-12, esta por sua vez induz células natural killer (NK) a sintetizar INF- $\gamma$ . A imunidade adaptativa é iniciada quando células APCs induzem a ativação de células TCD4 + virgem que na presença de IL-12 polarizam a diferenciação na subpopulação Th1. Células do padrão Th1 atuam de forma parácrina ativando linfócitos TCD8 + através da IL-2. Com as células TCD4+ e TCD8+ ativadas, há a produção de IFN- $\gamma$  levando a ativação de mecanismos microbicidas diretos e indiretos, como macrófagos M1, ativando produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que limitam a replicação intracelular de *T. gondii* e lise direta de reservatórios por células TCD8+

(LANNES-VIEIRA 2014).

Ainda que não possua papel central na resposta a microorganismos intracelulares, a resposta humoral é desencadeada neste contexto, por plasmócitos que sintetizam IgG, IgM, IgE e IgA contra taquizoítos extracelulares, este processo de opsonização de antígenos facilita a fagocitose por fagócitos (DUPONT *et al.*, 2012).

Em hospedeiro imunocompetente as formas assintomáticas somam a maioria dos casos, geralmente curando-se espontaneamente. Apenas 10 a 20% dos pacientes apresentam manifestações clínicas inespecíficas, como linfadenopatia isolada e febre em alguns casos. O curso da infecção é autolimitado, e o aparecimento de sinais e sintomas estão relacionados a virulência da cepa e o estado do sistema imune do hospedeiro (REMINGTON e KLEIN 1995; MONTOYA e LINSENFELD 2004; BUSHROD 2004).

A doença em imunocomprometidos está relacionada a infecção primária ou reativação de cistos, acarretando em doença neurológica grave. A principal patologia relacionada é a forma de encefalite toxoplásmica no sistema nervoso central. O dano no SNC é caracterizado por múltiplos focos de necrose que podem sofrer calcificação. Normalmente acomete pacientes que utilizam drogas imunossupressoras no tratamento de transplantes, doenças linfoproliferativas ou deficiência na imunidade celular, como o caso de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MONTOYA e LIESENFELD 2004; JONES *et al.*, 2014). Em relação a retinocoroidite toxoplásmica, é dada como uma das manifestações de maior ocorrência da doença e pode ser originada por via de transmissão materno/fetal, com manifestações precoces ou tardias, ou ainda adquiridas após o nascimento, resultado de infecção aguda ou reativação. O sinal clínico mais evidente é a retinocoroidite granulomatosa necrosante (GLASNER *et al.*, 1992; MONTOYA e REMINGTON, 1995). Outro aspecto importante da toxoplasmose se refere à toxoplasmose gestacional.

A toxoplasmose gestacional é caracterizada pela invasão de taquizoítos para os tecidos fetais através de via placentária, determinando a passagem vertical do parasito. Ocorre na infecção primária de fase aguda durante gestação ou ainda raramente durante o período de fase crônica, após o fenômeno de conversão bradizoíto/taquizoíto (KODJIAN 2010; COUTINHO *et al.*, 2012; WALLON e

PEYRON 2018; RATHA 2020). A infecção aguda entre mulheres grávidas é frequentemente assintomática, no entanto quando apresentam sintomas eles possuem caráter inespecífico como mialgia, febre baixa e linfadenopatia (GOLDSTEIN *et al.*, 2008; AHMED *et al.*, 2020). Segundo dados de Peyron e colaboradores (2019) a transmissão congênita do parasito não é obrigatória e dentre os principais fatores que influenciam nesta condição estão: período gestacional de infecção materna, tratamento ou não em gestantes positivas e tipo de cepa envolvida na infecção. As cepas de tipo II apresentam alta taxa de transmissão materno/fetal, porém infecções com cepas tipo I estão estreitamente relacionadas com sintomas graves da doença e infecções com cepa tipo III levam a infecções assintomáticas (RICO-TORRES *et al.*, 2016).

A depender do período de infecção, há diferentes consequências ao feto. Assim quando a transmissão vertical ocorre no primeiro semestre de gestação, a infecção pode ocasionar a morte fetal, com altas chances de aborto, devido à imaturidade imunológica dos tecidos fetais em relação à agressão ocasionada pelo parasito. Bem como, a indução de apoptose em células troncos neurais, resultando em graves más-formações congênicas e complicações neurológicas, auditivas, oculares e até à morte intrauterina (AMATO NETO e BARRONE 2008; BOTTARI *et al.*, 2019). Enquanto que durante o segundo semestre poderá levar a Tétrade de Sabin, caracterizada por calcificação intracraniana, hidrocefalia, coriorretinite e retardo mental. Em decorrência ao reparo do tecido fetal pela lesão causada pela infecção, acarretando obstrução do sistema de transporte do líquido cefalorraquidiano e intensa degradação de tecidos nervosos (AREAL *et al.*, 2008; MINEO e VITOR 2016). No terceiro semestre, o neonato poderá nascer normal ou apresentando sinais da doença em alguns dias, como: comprometimento ganglionar generalizado, hepatoesplenomegalia, miocardite, anemia, trombocitopenia ou ainda lesões oculares manifestada tardiamente (MOZZATO e PROCIANOY 2003; LOPES *et al.*, 2009; HIGA *et al.*, 2010, MINEO e VITOR 2016; STRANG *et al.*, 2020).

A gravidez é caracterizada como um processo de desenvolvimento com diferentes estágios imunológicos e altamente dinâmico, considera-se que a implantação e placentação, crescimento fetal e o parto como processos distintos, com diferentes desafios imunológicos que requerem um ambiente único que se

adapte às condições impostas (MOR *et al.*, 2017). As fases gestacionais estão relacionadas a três diferentes estágios imunológicos, sendo o primeiro marcado por um perfil pró-inflamatório, associado à implantação e placentação, para isto há a quebra ativa e reestruturação da decídua, sendo semelhante ao processo de lesão e reparo subsequente. As células dendríticas uterinas parecem ter papel na receptividade uterina, regulando a remodelação tecidual e a angiogênese (MOR *et al.*, 2017).

Após a fase de implantação e placentação, ocorre um rápido crescimento e desenvolvimento fetal, como nesta fase mãe e feto são simbióticos, há necessidade de conformação imunológica para um perfil anti-inflamatório, sendo que nesta fase qualquer sinal pró-inflamatório pode levar ao aborto espontâneo, bem como infecções ao nascimento prematuro (MOR *et al.*, 2017). Por fim, a preparação para o parto exige mudança do perfil anti-inflamatório para o pró-inflamatório novamente. O influxo de células imunes para o miométrio, promove a contração do útero, parto e separação da placenta (MOR *et al.*, 2017).

A infecção com cepas de alta virulência durante a gravidez, leva a infecção de populações de células imunes da decídua e placenta, sendo estas regiões com localizações e papéis importantes na imunomodulação da interface materno-fetal. Evidências apontam que o parasito afeta os estados de ativação de células dendríticas, células NK e trofoblastos, além de interromper o equilíbrio normal de subconjuntos de células T, favorecendo o desenvolvimento de células padrão Th1 e Th17 que são associadas ao controle parasitário, em detrimento de células do padrão Th2 e Treg associadas à tolerância imunológica (BORGES *et al.*, 2019).

Apesar de um grande número de pesquisas focaram na compreensão da resposta imunológica da toxoplasmose em pacientes imunocompetentes, há sempre a necessidade de investigações acerca dos aspectos imunopatogênicos na interface materno fetal (BORGES *et al.*, 2019). No intuito, inclusive, de promover o aprimoramento tanto do diagnóstico quanto do tratamento precoce da toxoplasmose.

### 1.5 CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS BEWO

Células BeWo foram isoladas a partir de um coriocarcinoma humano por Pattillo e Gey em 1968. Apesar de possuírem origem de um coriocarcinoma,

assemelham-se ao citotrofoblasto viloso humano. Apresentam características morfológicas e marcadores bioquímico como secreção de citocinas IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10, bem como síntese hormonal como progesterona, gonadotrofina coriônica humana, hormônio lactogênico placentário e estradiol semelhante ao encontrado em trofoblasto em primeiro trimestre, sendo importante meio para estudos *in vitro* (TSUI *et al.*, 2004; WOLFE 2006; BARBOSA *et al.*, 2008).

Apresentam susceptibilidade à infecção por *T. gondii*, desta forma torna-se importante ferramenta para estudos da infecção no contexto congênito, propiciando estudos imunológicos, fisiológicos dentre outros, além de não menos importante a busca por tratamentos alternativos para a toxoplasmose congênita (BARBOSA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2021).

#### 1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE

O diagnóstico clínico da toxoplasmose é complexo visto que a maior parte dos casos são assintomáticos e os sintomas, quando presentes, são inespecíficos. Portanto a importância do diagnóstico laboratorial, que pode ser realizado a partir da pesquisa do parasito em secreções orgânicas durante a fase aguda da infecção, ou a partir de biópsia em tecidos corados por hematoxilina-eosina, indicado para pesquisa de bradizoítos na forma crônica (GOODSON e DON WINSLOW 2013). Além disso, são realizados frequentemente na prática clínica testes sorológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes. (GOODSON e DON WINSLOW 2013). A reação em cadeia da polimerase, PCR tempo-real, é um método de alta sensibilidade capaz de detectar e amplificar fragmentos de DNA de *T. gondii* em diversas amostras biológicas, no entanto é pouco comum o emprego pelo seu elevado preço (FERREIRA e ÁVILA 2001).

O principal diagnóstico disponível durante a gravidez é o teste de ELISA-avidez, que visa analisar a força de ligação antígeno-anticorpo e assim determinar a fase da infecção de acordo com a avidez de IgG (TANIMURA *et al.*, 2015). Os parâmetros para o diagnóstico são: fase aguda da infecção são encontrados maior presença de anticorpos IgM e anticorpos IgG de baixa avidez. Quando são encontrados níveis baixos de IgM e IgG com avidez crescente, infere-se que a paciente está em fase de transição. Já na fase crônica da infecção, é caracterizada pela presença de anticorpos IgG com alta avidez (AHMED *et al.*, 2020). Importante

ressaltar que o diagnóstico precoce é de grande importância na toxoplasmose aguda uma vez que, possibilita a indicação do tratamento imediato reduzindo assim, os riscos graves promovidos por essa infecção.

O fármaco ideal para o tratamento da infecção por *T. gondii* deve apresentar propriedades parasitárias contra os diferentes estágios do parasito, distribuição nos sítios principais de infecção fetal e total isenção de toxicidade fetal e de efeitos teratogênicos. No entanto, nenhum fármaco atualmente utilizado no tratamento humano da toxoplasmose apresenta todos esses critérios (DEROUIN *et al.*, 2000; ELSHEIKHA 2008; BARBOSA *et al.*, 2015).

O tratamento convencional da toxoplasmose gestacional adotado pelo Ministério da Saúde preconiza principalmente a fase aguda no primeiro trimestre da gravidez, onde usualmente é indicado o uso via oral de espiramicina com o intuito de prevenir a infecção fetal. A espiramicina tem sido amplamente estudada devido a sua capacidade de prevenir a toxoplasmose congênita. Apresenta relativa segurança, atingindo concentração placentária significativa com alcance à tecidos fetais. No entanto apresenta baixo índice de redução da carga parasitária contra cepas do tipo RH (VALENTINI *et al.*, 2015; DUNAY *et al.*, 2018). Por se tratar de um antibiótico macrolídeo age ligando-se de forma irreversível a subunidade 50S ribossomal, onde impede a síntese de proteínas dependente de RNA (STEEL *et al.*, 2012).

Em casos de infecção fetal confirmada ou infecção após 18 semanas de gestação é indicado a combinação das drogas sulfadiazina e pirimetamina e suplementação de ácido fólico. Em neonatos o tratamento indicado é a associação de pirimetamina e sulfadiazina e interrompido após dois testes negativos com um mês de intervalo. Esta combinação apresenta-se como padrão ouro no tratamento clínico da toxoplasmose (MENDONÇA 2014; TABILE *et al.*, 2015). A sulfadiazina e a pirimetamina possuem mecanismos de ação sinérgico, alterando mecanismos de sobrevivência e replicação do parasito, tal efeito é produzido através do bloqueio da via de síntese do folato por meio da inibição das enzimas diidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), antagonizando respectivamente a formação de ácido diidrofólico e ácido tetraidrofólico (MENDONÇA 2014; SEPÚLVEDA-ARIAS *et al.*, 2014, CHOI e LEE 2018).

Petersen (2007) adverte acerca dos efeitos adversos que a sulfadiazina causa, sendo pouco tolerada pelo organismo, causando supressão de atividade da medula óssea que pode levar à anemia megaloblástica, leucopenia e granulocitopenia. Já a pirimetamina age indistintamente nos mecanismos bioquímicos tanto do hospedeiro quanto no parasito, além de possuir atividade teratogênica (SILVA 1998; KATZUNG 2006; TABILE *et al.*, 2015).

Devido à dificuldade no tratamento da toxoplasmose gestacional e congênita e toxicidade apresentada pelas drogas convencionais, há necessidade latente na descoberta de novos compostos para tratamento alternativo na infecção por *T. gondii*. Desta forma, pesquisas com compostos orgânicos apresentam relevância pela capacidade antimicrobiana, o que possibilita melhora na qualidade do tratamento, seja pela diminuição dos efeitos colaterais ou pela redução de custos de produção e venda. Sendo assim, é importante campo para indústria farmacêutica que busca alternativas no tratamento de doenças parasitárias (CHERAGHIPOUR *et al.*, 2020).

#### 1.6.1 Óleo Essencial de Orégano

Óleos essenciais são caracterizados por serem metabólitos secundários de plantas, evolutivamente necessários para garantia de adaptações importantes, como atividade antimicrobiana em plantas. São extraídos de diversas plantas, em geral, localizadas em países em zonas temperadas a quente, como mediterrâneo e países tropicais (BAKKALI *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2019). Possuem composição química complexa, são compostos voláteis, lípidos, lipossolúveis ou solúveis em solventes orgânicos e com densidade em geral inferior à água. Os princípios ativos, podem ser destinados a tratamento de doenças humanas por possuírem uma grande variedade de efeitos farmacológicos (VIEIRA *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2019).

Desta forma, a família Lamiaceae possui espécies consideradas plantas medicinais com potencial efeito antimicrobiano (MENDONÇA *et al.*, 2018). O óleo essencial de orégano (OEO) extraído da espécie *O. vulgare* possui diversos efeitos biológicos como um amplo efeito antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e antioxidante. Seus principais componentes são isômeros fenóis como o carvacrol e timol, além de seus precursores monoterpenos p-cymene e  $\gamma$ -terpineno em

menores concentrações. A presença de diferentes classes químicas e as potentes interações entre os componentes do OEO, possuem maior eficácia quando em mistura (SAKKAS e PAPADOPOULOU 2017).

Os mecanismos biológicos que o OEO possui relaciona-se a sua natureza lipofílica, atua na difusão através de membranas celulares, capaz de desestruturá-las, sendo vantajoso ao direcionar-se aos microrganismos intracelulares. Este mecanismo está intimamente relacionado a sua interação com ATPases, resultando em processo de perda de osmorregulação celular que em última instância leva ao extravasamento de íons fosfato, potássio e ATP (YOUSSEFI *et al.*, 2019; LOMBREA *et al.*, 2020).

Gaur e colaboradores (2018) e Dominguez-Uscanga e colaboradores (2021) utilizando OEO e timol (um dos principais componentes químicos presentes no OEO) sob *Cryptosporidium parvum* obtiveram resultados que indicam redução de proliferação, além de baixa citotoxicidade em células HCT-8 (adenocarcinoma de intestino grosso) indicando potencial antiparasitário. Em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, OEO apresenta aumento dos níveis de ERO e permeabilização em mitocôndria e lisossomos, acarretando estresse oxidativo e morte celular (LOMBREA *et al.*, 2020).

Apesar destes estudos, não há relatos na literatura de trabalhos utilizando OEO na infecção de *T. gondii* em células de origem trofoblástica. Tendo em mente a problemática apresentada anteriormente com relação ao tratamento convencional, é necessário abordagens que visam a descoberta de novos compostos como OEO anti-*T. gondii* principalmente enfatizando a interface materno fetal como proposto neste estudo utilizando para isso células de origem trofoblástica BeWo.

## 2 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antiproliferativo do óleo essencial de orégano (OEO), bem como os mecanismos envolvidos no processo de morte, em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) na infecção de células de linhagem trofoblástica humana BeWo.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade do tratamento com OEO na linhagem celular BeWo.
- Determinar a viabilidade de taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) tratados com OEO.
- Determinar índice de seletividade do tratamento com OEO em relação à célula hospedeira e parasito.
- Avaliar a atividade antiparasitária de OEO frente infecção com *T. gondii* (cepa RH) em células BeWo.
- Avaliar marcadores de estresse metabólico, sendo eles, integridade de membrana mitocondrial, espécies reativas de oxigênio, gotículas lipídicas decorrentes do tratamento direto com OEO em taquizoítos de *T. gondii*.
- Investigar eventos envolvidos com o processo de morte celular, autofagia, necrose e/ou apoptose, após o tratamento direto com OEO em taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH).
- Verificar através alterações morfológicas e ultraestruturais após tratamento com OEO em taquizoítos.

## REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animals. **Parasitosis**, 3 ed. Washington: OPS. v.3, p. 88-99, 2003.
- ADUGNA, B. *et al.*, Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* among pregnant women attending antenatal care in northwest Ethiopia. **Infection and drug resistance**, v.14, p. 1295–1303, 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S299106>
- AHMED, M.; SOOD, A; GUPTA, J. Toxoplasmosis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 255, p. 44-50, 2020.
- ALDAY, P. H.; DOGGETT, J. S. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 273–293, 2017.
- ALI-HAKIMI, M.; OLIAS, P.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 615-645, 2017.
- AMATO NETO, V.; BARONE, A. A. Toxoplasmose. In: AMATO NETO, V.; GRYSCHKEK, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 149-164, 2008.
- AREAL, K. R.; MIRANDA, A. E. Soroprevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas na rede básica de saúde de Vitória, ES. **ES. NewsLab**, v. 87, p. 122-9, 2008
- ARMAND, B.; *et al.*, *Toxoplasma gondii* Type I, predominant genotype isolated from sheep in South of Iran. **Veterinary World**, v. 10, n. 4, p. 386-392, 2017.
- ATTIAS, M.; *et al.*, The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animation. **Parasites Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2020.
- BAKKALI, F.; *et al.*, Biological effects of essential oils– A review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, B. F.; *et al.*, Bewo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* in increasead by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clinical & Experimental Immunology**, v.151, p. 536-545. 2008.

BARBOSA, M. A.; *et al.*, Potenciais alternativas terapêuticas em estudo para a toxoplasmose congênita: Uma revisão bibliográfica. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2015.

BARROS, H. L. S.; **Avaliação de epítomos derivados de micronema MIC8 e de antígeno de superfície SRS52A de *Toxoplasma gondii*, associados a diferentes adjuvantes, como possíveis antígenos vacinais contra a toxoplasmose.** 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

BLADER, I. J.; SAEJI, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: Impact on parasite growth, development, immune evasion and virulence. **APMIS**, v.117, n.5, p. 458-476, 2009.

BLADER, I.; COLEMAN, B.; CHEN, C-T.; GUBBELS, M-J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **The Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 463-485, 2015.

BORGES, M.; *et al.* How does toxoplasmosis affect the maternal-fetal immune interface and pregnancy? **Parasite immunology**, v. 41, n. 3, p. e12606, 2019.

BOTTARI, N. B.; *et al.* Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogliogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Neurobiology**, v. 56, p. 2328–2338, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo de Notificação e Investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 31 p.: il.

BUSHROD, F. Toxoplasmosis: Not just a risk during pregnancy. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, 2004.

CARMO, E. L.; *et al.*, Soroepidemiologia da infecção pelo *Toxoplasma gondii* no Município de Novo Repartimento, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica Saúde [online]**, v.7, n. 4, p. 79-87, 2016.

CASTILHO-PELLOSO, M. P.; *et al.*, Monitoring of pregnant women with toxoplasmosis in Public Health Services. **Revista Sociedade Brasileira de**

**Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 532-533, 2005.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, setembro 2018. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>>. Acesso em: 23 março 2022.

CHERAGHIPOUR, K.; et al. The experimental role of medicinal plants in treatment of *Toxoplasma gondii* infection: A systematic review. *Acta Parasitologica*, v. 66, p. 303–328, 2021.

CHOI, W. H.; LEE, I. A. Evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* effect of ursolic acid as a novel toxoplasmosis inhibitor. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 11, n. 43, 2018.

CORTEZ, E.; et al., NAD (P) H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1052-1057, 2005.

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. 3645, 2021.

COUTINHO, L. B.; et al., The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. **International Journal for Parasitology**, v.42, p. 341-352. 2012.

DA SILVA, L. L.; et al., Atividades terapêuticas do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 6, p. 6011-6021, 2019.

DE MOURA, L.; et al., Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 326, 2006.

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

DEROUIN, F.; et al., Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 12, p. 1089-1101, 2008.

DOMINGUEZ-USCANGA, A.; et al., Antiprotozoal activity of Thymol and a Thymol ester against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. **International Journal for**

**Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 15, p. 126-133, 2021.

DUBEY, J. P.; Toxoplasmosis of animals and humans. **Boca Raton: CRC Press**, 1988.

DUBEY, J. P.; *et al.*, 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.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology, Reino Unido**, v. 139, n. 11, 2012.

DUMETRE, A.; *et al.*, Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 905-912, 2012.

DUMETRE, A.; *et al.*, Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 110, n. 28, p. 11535-11540, 2013.

DUNAY, I. R. *et al.*, Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018.

DUPONT, C.; CHRISTIAN, D.; HUNTER, C. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology, Philadelphia**, v. 34, n. 6, p. 793-813, 2012.

ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public health**, v. 122, n. 4, p. 335-353, 2008.

FENOY, I. M.; *et al.*, The known unknowns: exploring the homologous recombination repair pathway in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 627, 2016.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. ed - **Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitárias e autoimunes. Correlação clínico-laboratorial**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. 302p

- FIALHO, C. G.; Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 1-23, 2009.
- FISCH, D.; CLOUGH, B.; FRICKEL, E. M. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v.15, n.12, p.e1008097, 2019.
- FLEGR, J.; *et al.*, Toxoplasmosis – a global threat. correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e90203, 2014.
- GAUR, S.; *et al.* Effect of oregano essential oil and carvacrol on *Cryptosporidium parvum* infectivity in HCT-8 cells. **Parasitology International**, v. 67, n. 2, p. 170-175, 2018.
- GLASNER, P. D.; *et al.*, An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v.114, n. 2, p. 136-144. 1992.
- GOLDSTEIN, E. J. C.; *et al.*, Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.
- GOODSON, M. B.; DON WINSLOW. *Toxoplasma gondii*: Prevalence in humans and animals, genetic structure and role in disease distribution. **Nova Science Publishers**, Inc.; 1ª Edição, 2013.
- HASSAN, M. A.; *et al.* Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse subspecies. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 63-70, 2019.
- HIGA L. T.; *et al.*, A prospective study of *Toxoplasma-positive* pregnant women in southern Brazil: A health alert. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.4, n.6, p.400-405. 2010.
- HU, K.; *et al.*, Cytoskeletal components of an invasion machine- The apical complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 2, 2006.
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D.; Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2012.
- JIMENEZ-RUIZ, E.; MORLON-GUYOT, J.; DAHER, W.; MEISSNER, M. Vacuolar

protein sorting mechanisms in apicomplexan parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 209, n. 1-2, p. 18-25, 2016.

JONES, J. L.; DUBEY, J. Epidemiologia da Toxoplasmose. In: SOUZA, W.; BELFORT JR., R. (org). **Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014.

JOHELAINEN, P.; MURAT, J. B.; NIELSEN, H.V. Direct genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from clinical samples from Denmark: not only genotypes II and III. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p.579-586, 2018.

KATO, K.; How does *Toxoplasma gondii* invade host cells? **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 11, p. 1702–1706, 2018.

KATZUNG, B. C. **Farmacologia Básica & Clínica**, 9° ed., p. 546 - 554, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KODJIKIAN, L. *Toxoplasma* and pregnancy. **Journal Français D' Ophtamologie**, v.33, n.5, p.362-367, 2010.

LANNES-VIEIRA, J. Resposta Imune na Infecção por *Toxoplasma gondii*: desafios e oportunidades. In: SOUZA, W.; BELFORT J. R. R. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, p. 83-98, 2014.

LIU, M.; *et al.*, Characterization of protein arginine methyltransferase of TgPRMT5 in *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 221, 2019.

LOMBREA, A.; *et al.*, A Recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. **Essential Oil. International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9653, 2020.

LOPES, F. M. R.; *et al.*, Factors associated with seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 378-382. 2009.

LÜDER, C. G. K.; RAHMAN, T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. **Microbial Cell**, v. 4, n. 7, p. 203-211, 2017.

MENDONÇA, J. S. Princípios gerais de terapêutica. In: SOUZA, W.; BELFORT J. R. R. **Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.

209-214, 2014.

MENDONÇA, K. F.; CARNEIRO, J. K. R.; OLIVEIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso, hidroalcoólico e alcoólico de folhas de espécies da família Lamiaceae. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, 2018.

MIHU, A.G., *et al.*, Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in females aged 15-45 years from Bihor County, western Romania. **Vector-Borne Zoonotic Diseases Journal**, Ahead of print, 2022.

MINEO, J. R.; VITOR, R. W. A. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. Parasitologia Humana. 13. ed. São Paulo: **Atheneu**, p. 186-192, 2016.

MOLAN, A.; *et al.*, Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. **Tropical Biomedicine**, v. 36, n. 4, p. 898-925, 2019.

MONTAZERI, M.; *et al.*, Systematic review of *in vitro* and *in vivo* activities of anti-*Toxoplasma* drugs and compounds (2006-2016). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 25, p. 1-31, 2017.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 12, p. 1965-1975, 2004.

MOR, G.; ALDO, P.; ALVERO, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 8, p. 469-482, 2017.

MORRISSETTE, N. Targeting *Toxoplasma* tubules: tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 1, p. 2-12, 2015.

MOTA, C. M.; *et al.*, New molecular tools in *Neospora caninum* for studying apicomplexan parasite proteins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3768, 2017.

MOUSAVI-HASANZADEH, M., *et al.*, Evaluation of *Toxoplasma gondii* infection in western Iran: Seroepidemiology and risk factors analysis. **Tropical medicine and health**, v. 48, p. 35, 2020.

MOZZATO, L.; PROCIANOY, R. S. Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: A prospective study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**

**São Paulo**, v.45, n.3, p.147-151. 2003.

MUKHOPADHYAY, Debanjan; ARRANZ-SOLÍS, David; SAEIJ, Jeroen PJ. Influence of the host and parasite strain on the immune response during *Toxoplasma* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 586, 2020.

OPITZ, C.; SOLDATI, D. 'The glideosome': A dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 597-604, 2002.

PAREDES-SANTOS, T. C.; *et al.*, Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Structural Biology**, v.177, p. 420–430, 2012.

PASSOS, A. D. C.; *et al.*, Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among adults in a small Brazilian city. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 6, p. 781-787, 2018.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, p. 214-223, 2007.

RAETZ, M.; *et al.*, Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 9, p. 4818-4827, 2013.

RATHA, C.; Toxoplasmosis in Pregnancy. **Journal of Fetal Medicine**, v. 7, n. 1, p. 31-35, 2020.

REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. Infections, diseases of the fetus and newborn infant. 4 ed. **WB Saunders Company**, p.140-268. 1995.

REMINGTON, J. S.; *et al.*, Infectious diseases in the fetus and newborn infant. In: (Ed.). **Toxoplasmosis**, 5 ed., 2001.

REMINGTON, J. S.; *et al.* In: **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**, 8 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016.

RICO-TORRES, C. P.; VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; CORREA, D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. **European Journal of Clinical Microbiology &**

**Infectious Diseases**, v. 35, n. 7, p. 1079-1088, 2016.

ROBERT-GANGNEUX, F.; It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, v. 68, p. 125-133, 2014.

ROSTAMI, A.; *et al.*, Acute *Toxoplasma* infection in pregnant women worldwide: a systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 10, p. e0007807, 2019.

ROSTAMI, A.; *et al.*, Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 6, p. 673-683, 2020.

ROUGIER, S.; MONTOYA, J.G.; PEYRON, F. Lifelong persistence of *Toxoplasma* cysts: a questionable dogma? **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 93-101, 2017.

SAEJI, J. P. J.; *et al.*, Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v.21, n.10, p.476-481, 2005.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 429-438, 2017.

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 113-119, 2018.

SEPÚLVEDA-ARIAS J.; *et al.* Anti-*Toxoplasma* activity of natural products: A review. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 186-194, 2014.

SHAPIRO, K.; *et al.*, Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1185-1191, 2009.

SIBLEY, L.D.; *et al.*, Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. **Philos Transactions Royal Society**. v. 357, p. 81-88, 2002.

SILVA, P. Sulfonamidas e outros quimioterápicos. In: Farmacologia. 5ª Ed.

**Guanabara Koogan**, Cap. 114, p.1021-1035, 1998.

SINAI, A. P.; Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. In: Molecular Mechanisms of Parasite Invasion. **Springer**, New York, p. 155-164, 2008.

SMITH, N. C.; *et al.*, Control of human toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 2-3, p. 95-121, 2020.

SOKOL-BORRELLI, S. L.; COOMBS, R. S.; BOYLE, J. P. A. comparison of stage conversion in the coccidian apicomplexans *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, e *Neospora caninum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1-14, 2020.

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, v. 12, p. 1293-1302, 2001.

SOUZA, Adriane; *et al.* Taxa de mortalidade por toxoplasmose por regiões brasileiras: um estudo retrospectivo do período de 2009 – 2018. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, v. 33, n. 2, p. 21-29, 2021.

STEEL, H.C.; *et al.*, Pathogen-and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p.17 2012.

STRANG, A. G. G. F.; *et al.*, The congenital toxoplasmosis burden in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, p. 105608, 2020.

SUAREZ, C.; LODOEN, M. B.; LEBRUN, M. Assessing rhoptry secretion in *T. gondii*. In: *Toxoplasma gondii*. **Humana**, New York, p. 143-155, 2020.

SUGI, T.; *et al.*, *Toxoplasma gondii* requires glycogen phosphorylase for balancing amylopectin storage and for efficient production of brain cysts. **mBio**, v. 8, n. 4, p. e01289-17, 2017.

TABILE, P. M.; *et al.*, Toxoplasmose gestacional: Uma revisão da literatura. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 3, p. 158-162, 2015.

TANIMURA, K.; *et al.*, The IgG avidity value for the prediction of *Toxoplasma gondii* infection in the amniotic fluid. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.

21, n. 9, p. 668-671, 2015.

TOMITA, T.; *et al.*, Making home sweet and sturdy: *Toxoplasma gondii* ppGalNAc-Ts glycosylate in hierarchical order and confer cyst wall rigidity. **mBio**, v. 8, n.1, p. e02048- e0204816, 2017.

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: A systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, p. 501-508, 2013.

TSUI, K.H.; *et al.*, Interleukin-8 can stimulate progesterone secretion from a human trophoblast cell line, BeWo. *in vitro* **Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 40, n. 10, p. 331-336, 2004.

TU, V.; *et al.*, Enrichment and proteomic characterization of the cyst wall *from in vitro* *Toxoplasma gondii* cysts. **mBio**, v. 10, n. 2, p. e00469-19, 2019.

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.

VAUDAUX, J. D.; *et al.*, Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **Journal of the Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1226-1233, 2010.

VAZ, R. S.; *et al.*, Toxoplasmose congênita: Uma doença negligenciada? Atual política de saúde pública brasileira. **Field Actions Science Reports. The journal of field actions**. Special Issue 3, 2011.

VIEIRA, A. J.; *et al.*, Limonene: aroma of innovation in health and disease. **Chemiolinteract**, v. 283, p. 97-106, 2018.

VILLAR, B. B. F.; *et al.* Toxoplasmosis in pregnancy: a clinical, diagnostic, and epidemiological study in a referral hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 517-523, 2020.

WALLON, M.; PEYRON, F. Congenital toxoplasmosis: a plea for a neglected disease. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 25, 2018.

WOLFE, M. W. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. In: **Placenta and Trophoblast**. Human Press, p. 229-239, 2006.

XIAO, J.; YOLKEN, R. H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica** (Oxford, England), v. 213, n. 4, p. 828–845, 2015.

YAN, C.; *et al.*, Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasite & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016.

YOUSSEFI, M. R.; *et al.*, *In vitro* and *in vivo* effectiveness of carvacrol, thymol and linalool against *Leishmania infantum*. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2072, 2019.

ZHANG, Y.; *et al.*, *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. **Microbiological Research**, v.227, p. 126293, 2019.

ZHU, W.; *et al.*, Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to survive in the host. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019

**3 ARTIGO CIENTÍFICO CONFORME EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY –**

Fator de impacto 4.432 (2021-22)

OREGANO (*Origanum vulgare*) ESSENTIAL OIL REDUCES *Toxoplasma gondii*  
PROLIFERATION IN BeWo CELLS BY INDUCING METABOLIC STRESS IN  
EXPERIMENTALLY INFECTED CELLS

Angélica Paulina Nunes<sup>1</sup>, Yasmin Munhoz dos Santos<sup>1</sup>, Raquel Arruda da Silva Sanfelice<sup>1</sup>, Virgínia Marcia Concato<sup>1</sup>, Taylon Felipe Silva<sup>1</sup>, Fernanda Tomiotto-Pellissier<sup>1</sup>, Danielle Lazarin-Bidoia<sup>1</sup>, Larissa Rodrigues Bosqui<sup>1</sup>, Luiz Daniel de Barros<sup>2</sup>, João Luis Garcia<sup>2</sup>, Ivete Conchon-Costa<sup>1</sup>, Wander Rogério Pavanelli<sup>1</sup> Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>4</sup>, Bellisa de Freitas Barbosa<sup>3</sup>, Eloisa Amália Vieira Ferro<sup>3</sup>, Idessania Nazareth Costa<sup>1</sup>.

E-mail: idessania@hotmail.com

<sup>1</sup> Departamento de Patologia Experimental – Laboratório de Imunoparasitologia das Doenças Negligenciadas e Câncer. Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária - Laboratório de Protozoologia Animal. Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. It has in public health mainly for promoting, sometimes, serious conditions in the public majority. Current treatment is limited to the use of spiramycin or the association of sulfadiazine, pyrimethamine and folinic acid. The effects of medicines lead to the need for new therapies. Thus, the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) (OEO) presents itself as a promising alternative due to its antibacterial, antifungal and antiparasitic potential. The objective of this work was to analyze the antiproliferative capacity and the mechanisms of the direct action of OEO in tachyzoites of *T. gondii* (RH strain). To investigate the toxicity of OEO in BeWo cells,

the MTT assay was performed using concentrations from 0.7 to 150 µg/mL. To evaluate the viability of tachyzoites after treatment with OEO, the trypan blue exclusion method was used. Then, the cytotoxic (CC<sub>50</sub>), inhibitory (IC<sub>50</sub>) and selectivity index (SI) concentrations were calculated. The antiproliferative activity of the OEO treatment was determined by the rates of infection and intracellular proliferation of the parasite treated with OEO using concentrations 6.2; 12; 25 and 50 µg/mL and confirmed by light microscopy using toluidine blue staining. The mechanisms involved in the direct death of the parasite were also evaluated, namely, levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential and lipid droplets. Apoptosis and plasma membrane permeabilization were investigated by flow cytometry by labeling with Annexin-V and propidium iodide, in addition to autophagy by monodansylcadaverine. To evaluate topology (SEM) and ultrastructure (TEM) scanning and transmission electron microscopy analyzes were performed. OEO treatment showed low cytotoxicity on BeWo cells (CC<sub>50</sub> of 114.8 µg/mL ± 0.01), reduced tachyzoite viability (IC<sub>50</sub> of 12.5 ± 0.06 µg/mL), and IS of 9.18. There was a reduction in intracellular proliferation of 55% and 84% at concentrations of 25 and 50 µg/mL, respectively. In free tachyzoites, treatment caused increased levels of ROS, mitochondrial membrane depolarization and lipid droplet formation, as well as mitochondrial swelling seen in TEM. These alterations are linked to the induction of the process of autophagy and permeabilization of the plasma membrane, with extravasation of the cytoplasmic content and nuclear alterations, confirmed by TEM and SEM, culminating in a process of cell death. OEO treatment demonstrated anti-*Toxoplasma* directing the death of the parasite by metabolic changes without causing toxicity to the cells, which may be a promising compound in the treatment of toxoplasmosis.

**Keywords:** Toxoplasmosis, Alternative treatment, *Origanum vulgare*.

## 1 Introduction

Toxoplasmosis, a disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, is considered a cosmopolitan zoonosis, being prevalent in up to 60% of the population in some regions of the world (CDC, 2018). In most cases, the infection is asymptomatic; however, it is severe in immunocompromised patients and

congenital toxoplasmosis (Smith *et al.*, 2021).

It is known that tachyzoites can cross the placental barrier, so infection before or during pregnancy could result in vertical transmission and reach fetal tissues (Peyron *et al.*, 2017). Miscarriage, stillbirth, death in the fetal period, fetal anomalies, chorioretinitis, and encephalitis are the most severe consequences for the concept infected congenitally (Aguirre *et al.*, 2019).

The recommended treatment for congenital toxoplasmosis depends on the gestational stage but is based on spiramycin, sulfadiazine, pyrimethamine, and folinic acid supplementation. The use of sulfadiazine and pyrimethamine has several disadvantages, such as resistance and adverse effects such as bone marrow suppression. In addition, they have high toxicity and teratogenic effects (Montoya and Remington, 2008; Meneceur *et al.*, 2008). Based on this, there is a need to investigate new alternative therapies for toxoplasmosis (Elazab *et al.*, 2021).

Previous studies have shown that the oregano essential oil (OEO) extracted from the species *Origanum vulgare* has several biological effects, including antibacterial (Ebani *et al.*, 2018), antifungal (Manohar *et al.*, 2001), antioxidant (Moghrovyan *et al.*, 2019) and antiparasitic (Gaur *et al.*, 2018), even *T. gondii* (Yao *et al.*, 2021). These effects are due to the potent interactions of its chemical components, such as carvacrol, thymol,  $\gamma$ -terpinene, p-cymene, and  $\beta$ -caryophyllene (Bassolé and Juliani 2012; Lombrea 2020).

Based on this, the present study aimed to investigate the mechanisms of direct or indirect action of OEO in tachyzoites in lineage cells of trophoblastic origin

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Oregano essential oil (OEO)**

The OEO was kindly provided by Dr. Renata Katsuko Takayama. It was acquired commercially from Indústria e Comércio de Óleos Ferquima (São Paulo). This oil was extracted by steam distillation, and its density (0.954 g/mL) and composition (main components: carvacrol, thymol,  $\gamma$ -terpinene, p-cymene, and  $\beta$ -caryophyllene) were described in a technical report (CAS number 84012-24 -8, lot 224). A 50% OEO stock solution was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The maximum concentration of DMSO in the tests was 0.01%, according to Scandorieiro *et al.* (2016).

## 2.2 BeWo Cell Culture

BeWo cells were provided by Dr. Eloísa Amália Vieira Ferro from the Federal University of Uberlândia. BeWo cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> or 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (Ciencor Scientific, São Paulo, SP, Brazil) with RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), L-glutamine, sodium pyruvate and 2 $\beta$ -mercaptoethanol. Cell culture was maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.3 *T. gondii* strain

Tachyzoites from the RH strain, obtained from peritoneal lavage of Swiss Webster mice previously infected, were used for experimental infection of BeWo cells. Briefly, peritoneal exudates from mice were collected in sterile phosphate-buffered-saline (PBS), passaged through a 26G needle three times, and washed twice. The sediment was resuspended in sterile PBS, and tachyzoites were counted in a Neubauer chamber. All procedures involving the animals in this study were approved by the Ethics Committee in the Use of Animals of the State University of Londrina (no. 88/2017/CEUA)

## 2.4 BeWo Cell viability assay

The viability of BeWo cells after OEO treatment was evaluated based on mitochondrial oxidation by a colorimetric MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) (Mosmann, 1983). BeWo cells were grown in 96-well plates (3x10<sup>4</sup> cells/well/200  $\mu$ L) for 24 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After this, the cells were treated for 24 h with OEO at different concentrations (0.7-150  $\mu$ g/mL). Cells treated with sulfadiazine and pyrimethamine (50 and 25  $\mu$ g/mL, respectively) were used as a positive control. In contrast, cells that received only the culture medium were used as a negative control. After treatment, the culture medium was removed, and the cells were incubated in MTT solution (5 mg/mL) for 3 h under the same growth conditions.

The formazan crystals were solubilized in 100  $\mu$ L DMSO, and after 30 minutes of incubation, the absorbance (abs) was measured at 540-560 nm using a plate reader (TP Reader, Thermo Plate). Results were expressed as the percentage

reduction in MTT relative to the control group, calculated with the following formula:  
viable cells (%) = (abs from treated cells/abs from untreated cells) x 100.

## 2.5 Trypan blue tachyzoite viability assay

The viability of *T. gondii* tachyzoites after treatment with OEO was performed as previously described by Sanfelice et al. (2017).  $5 \times 10^5$  tachyzoites were treated with different concentrations (0.7-150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of OEO. Sulfadiazine and pyrimethamine (50 and 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively) were used as the positive control, and no treatment was the negative control. The parasites were incubated for 1 h at 37°C with 5%  $\text{CO}_2$ . After this time, the parasites were stained with trypan blue and counted using a Neubauer chamber under a light microscope (E100, Nikon-LED).

## 2.6 Selectivity Index

The effect of OEO on *T. gondii* tachyzoites was expressed as the minimum inhibition concentration to inhibit 50% of the parasites ( $\text{IC}_{50}$ ) and in the cytotoxicity of human trophoblastic lineage cells (BeWo) as a cytotoxic concentration to cause the death of 50% of the cells ( $\text{CC}_{50}$ ).  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{CC}_{50}$  were calculated by non-linear regression (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The selectivity index value was expressed as  $\text{SI} = \text{CC}_{50}$  of OEO in BeWo cells/ $\text{IC}_{50}$  of OEO in tachyzoites, according to Miranda-Sapla et al. (2019).

## 2.7 Post-treatment experimental infection

As previously described by Machado et al. (2020), for the post-treatment model, BeWo cells ( $1 \times 10^5$ ), maintained in 24 well plates containing 13 mm round coverslips (Ciencor Scientific), were infected with  $5 \times 10^5$  tachyzoites of *T. gondii*. After 3 h of infection, the cells were washed and treated with the association of sulfadiazine and pyrimethamine (50 and 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), respectively, and OEO at concentrations of 6.2, 12, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h. After 24 hours, coverslips were stained with 1% toluidine blue (Sigma- Aldrich), slides were mounted for analysis under a light microscope (E100, Nikon-LED), and representative images were captured under the same conditions.

The infection rate (number of infected cells per 200 cells examined) and intracellular proliferation of the parasite (total number of parasites per 200 cells examined) were analyzed under light microscopy. Counts were performed using a

double-blind method. Slides were stained with toluidine blue for light microscopy analysis.

## **2.8 Direct mechanisms of parasite death**

### **2.8.1 Determination of parasite cell volume**

In order to analyze the effect of the treatment on the size of the tachyzoites, this technique was performed as follows: *T. gondii* tachyzoites were treated with an IC<sub>50</sub> concentration (12.5 µL) of OEO and incubated for 1 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, and washed with PBS. Subsequently, the parasites were analyzed using a BD Accuri™ C5 Plus flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) according to the methodology described by Tomiotto-Pellissier et al. (2018). The histograms were generated based on the forward scatter parameter (FSC-A), which represents the cell size, and the side scatter (SSC-A), which represents the cell complexity. A total of 20.000 events were acquired in the region corresponding to the parasites, and untreated tachyzoites were used as a negative control.

### **2.8.2 Determination of mitochondrial membrane potential**

In order to assess the integrity of the inner mitochondrial membrane of the parasite after OEO treatment, the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was investigated by labeling with tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) (Sigma-Aldrich) as previously described (Nishi et al., 2021; Sanfelice et al., 2021). Briefly, *T. gondii* tachyzoites ( $1 \times 10^6$ ) were treated with IC<sub>50</sub> of OEO (12.5 µL) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. After this period, labeling was performed with TMRE (25 nM) and incubated for 30 minutes at 37°C. The excitation and emission wavelengths of 488 nm and 530 nm were measured using a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was used as positive control while untreated tachyzoites as the negative control.

### **2.8.3 Generation of reactive oxygen species (ROS) in tachyzoites**

To evaluate the alteration in ROS formation, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCDFA) (Sigma-Aldrich) probe, which is essentially sensitive to hydroxyl radicals and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), was used as previously described (Nishi et al., 2021; Sanfelice et al., 2021). For this,  $1 \times 10^6$  of tachyzoites were treated

with a concentration of 12.5  $\mu\text{L}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) of OEO for 1 h and incubated at 37°C with 5%  $\text{CO}_2$ . After the treatment, 10  $\mu\text{L}$  of the probe was added and incubated for 45 minutes in the dark at 37°C. A spectrophotometer (Victor X3, PerkinElmer) was used to read the excitation and emission wavelengths of 488 nm and 530 nm, respectively.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.4%) was used as the positive control while untreated tachyzoites as the negative control.

#### **2.8.4 Determination of lipid bodies by Nile red**

The presence of neutral lipid droplets was determined as a complementary analysis to the mechanisms involved in metabolic stress based on the Nile red marking according to the methodology previously described (Nishi et al., 2021; Sanfelice et al., 2021). Tachyzoites ( $1 \times 10^6$ ) were treated with 12.5  $\mu\text{L}$  OEO ( $\text{IC}_{50}$ ) for 1 h and then labeled with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Nile red (Sigma-Aldrich) for 30 minutes. The reading was performed in a spectrophotometer at 488 nm of excitation and 530 nm of emission (Victor X3, PerkinElmer). PBS was used as the positive control and untreated tachyzoites as the negative control.

#### **2.8.5 Investigation of the formation of autophagic vacuoles**

In order to evaluate whether OEO treatment induces the formation of autophagic vacuoles, a process of metabolic recycling under stress, tachyzoites ( $1 \times 10^6$ ) were treated with  $\text{IC}_{50}$  (12.5  $\mu\text{L}$ ) for 1 h and labeled with monodansylcadaverin (50  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich) according to Sanfelice et al. (2021) and Nishi et al. (2021). The reading was performed in a spectrophotometer at 488 nm of excitation and 530 nm of emission (Victor X3, PerkinElmer). The positive control group was treated with PBS, and the negative control group was composed of untreated tachyzoites.

#### **2.8.6 Determination of phosphatidylserine exposure and cell membrane integrity**

Tachyzoites ( $1 \times 10^6$ ) were treated with OEO at  $\text{IC}_{50}$  (12.5  $\mu\text{L}$ ) for 1 h at 37°C. Then, the parasites were washed and resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of assay buffer (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), followed by the addition of a mixture containing 1  $\mu\text{L}$  of annexin V-FITC and 1  $\mu\text{L}$  of propidium iodide (PI) (Santa Cruz Biotechnology). The analysis of phosphatidylserine exposure, as an event

suggestive of apoptosis, was detected using Annexin-V FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the cell membrane integrity of the parasites was evaluated by labeling with propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich). Parasites not treated were used as a negative control, as previously described by Bortoleti et al. 2018. Results were analyzed using FlowJo software (BD Biosciences).

### **2.8.7 Morphological and ultrastructural evaluation of tachyzoites by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy(TEM)**

Scanning electron microscopy (SEM) was performed to analyze changes in cell surface topography. For sample preparation, tachyzoites ( $1 \times 10^6$ ) were treated with OEO with  $IC_{50}$  (12.5  $\mu$ L) for 1 h at 37°C and then centrifuged and washed with PBS. After treatment, they were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. The samples were placed on slides containing poly-L-lysine, dehydrated with increasing ethanol concentrations (30 - 100%), and dried in a critical point chamber (Baltec SCD-030). Finally, they were metalized with gold and visualized in high resolution through a double-beam electron microscope FEI SCIOS (Fei Company, Hillsboro, OR, USA).

Tachyzoites were treated and fixed as described above to evaluate the ultrastructural changes by transmission electron microscopy. Then, the parasites were post-fixed with 1% osmium tetroxide  $OsO_4$ , 0.8% potassium ferrocyanide, and 10 mM  $CaCl_2$  in 0.1 M sodium cacodylate buffer. In sequence, they were dehydrated in increasing acetone concentrations (30 - 100%). Sections were made using an ultramicrotome (PowerTomer BMC) and contrasted with 5% uranyl acetate and 2% lead citrate. The analysis was processed using a JEOL JEM 1400 transmission electron microscope (Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

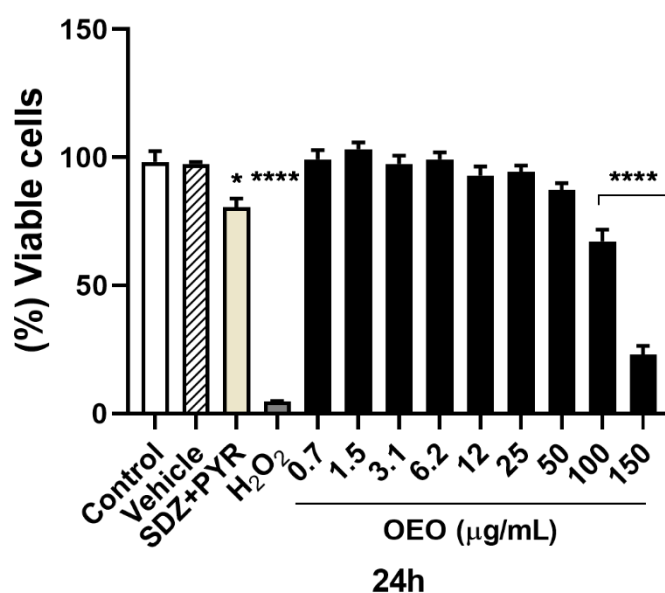
### **2.9 Statistical analysis**

Statistical analyzes were performed in GraphPad Prisma 8 software (GraphPad Software Inc.). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Differences between groups were evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. P-value  $<0.05$  was considered to be statistically significant.

## **3 Results**

### 3.1 OEO treatment has low toxicity in BeWo cells

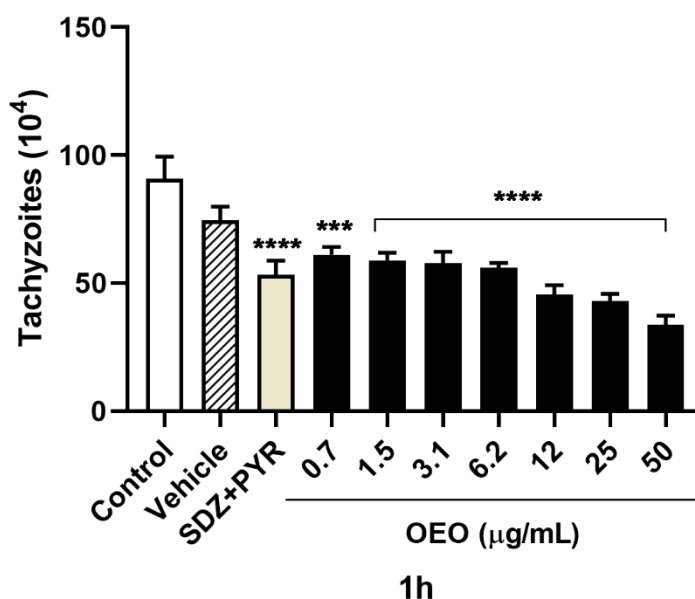
Cell viability was initially evaluated after OEO treatment at different concentrations (0.7-150  $\mu\text{g/mL}$ ). OEO was not toxic to BeWo cells after 24 h; however, it showed a reduction in the highest concentrations (100 and 150  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 1A**). Subsequently, the 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) was calculated, obtaining a value of 114.8  $\mu\text{g/mL} \pm 0.01$  (**Table 1**).



**Figure 1- Oregano essential oil (OEO) does not cause toxicity in BeWo cells.** BeWo cells were treated for 24 h with different concentrations (0.7-150  $\mu\text{g/mL}$ ) of OEO or sulfadiazine/pyrimethamine (SDZ + PYR) (50 and 25  $\mu\text{g/mL}$  respectively). Cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used as positive control and DMSO as vehicle control. Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significant differences from the negative control \* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ).

### 3.2 OEO treatment reduces tachyzoite viability

The direct effect of treatment with different concentrations (0.7-50  $\mu\text{g/mL}$ ) of OEO on *T. gondii* tachyzoites was evaluated by light microscopy. After 1 h, tachyzoites treated with 0.7  $\mu\text{g/mL}$  showed a reduction of 29% ( $p < 0.0003$ ), 1.5 - 6.2  $\mu\text{g/mL}$ , 35% and 12 - 50  $\mu\text{g/mL}$  > 45% ( $p < 0.0001$ ). The vehicle (DMSO) showed no effect on the parasite at the time tested (**Figure 2A**). After this assay, the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ( $12.5 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ) was calculated (**Table 1**), and this concentration was selected for the next experiments.



**Figure 2– Oregano essential oil (OEO) has a toxoplasmodicidal effect.** Tachyzoites were treated for 1 h with different concentrations (0.7-50 µg/mL) of OEO or sulfadiazine/pyrimethamine (SDZ + PYR) (50 and 25 µg/mL, respectively). DMSO-treated tachyzoites vehicle control. Values represent the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significant differences from the negative control \*\*\* (p < 0.0003), \*\*\*\* (p < 0.0001).

### 3.3 OEO has greater selectivity on *T. gondii*

Considering the low cytotoxicity of the treatment in cells of human trophoblastic lineage and direct action on tachyzoite forms, a selectivity index (SI) was calculated, obtaining a value of 9.18 (Table 1).

**Table 1:** Oregano essential oil has selectivity over tachyzoites

OEO	BeWo - CC <sub>50</sub>	Extracellular tachyzoites - IC <sub>50</sub>	SI
	114.8 µg/mL ± 0,01	12.5 µg/mL ± 0,06	9.18

OEO: Oregano essential oil; BeWo: Human trophoblastic cell line; CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>: Cytotoxic/inhibitory concentration of 50%; ±: Standard deviation, SI: Selectivity index; µg/mL: Micrograms/milliliters.

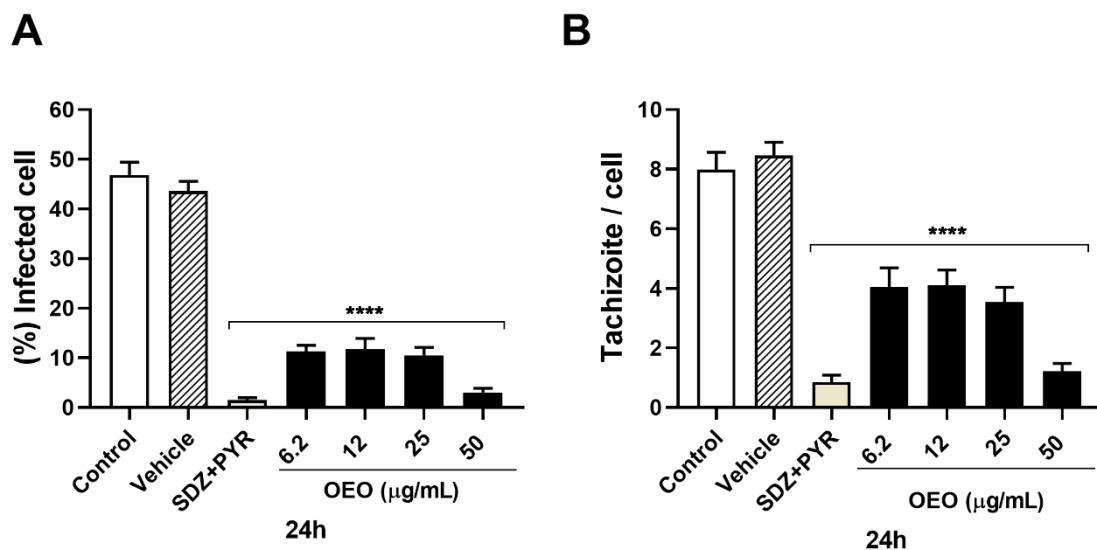
### 3.4 OEO has antiproliferative activity on *T. gondii* tachyzoites

The effectiveness of OEO treatment was evaluated according to the infection rates and intracellular proliferation of *T. gondii* tachyzoites for 24 h, using concentrations of 6.2, 12, 25, and 50 µg/mL. Infection rates were reduced by 35% at 6.2 and 12.5 µg/mL, 36% and 43% at 25 and 50 µg/mL, respectively, compared

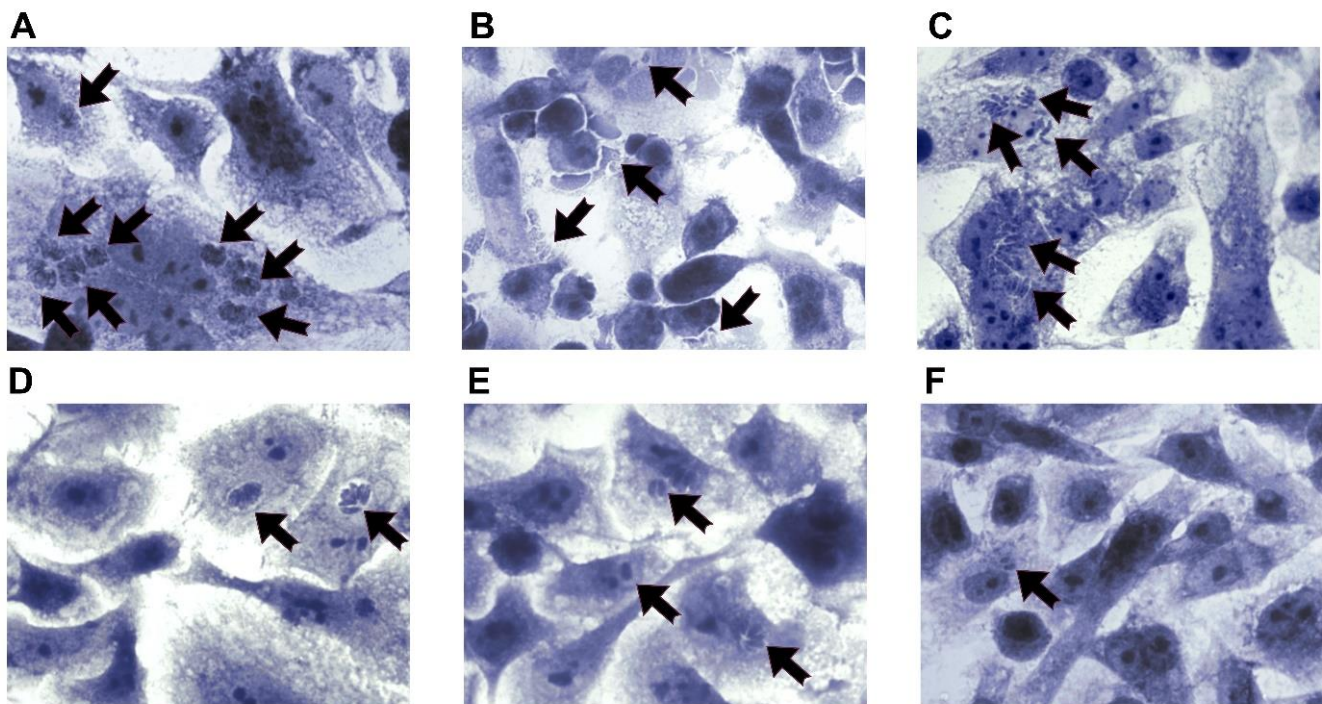
to the control group ( $p < 0.0001$ ). In addition, SDZ+PYR also reduced parasite infection ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 3A**).

There was a decrease of 49% in the proliferation of tachyzoites in BeWo cells at concentrations of 6.2 and 12  $\mu\text{g/mL}$  and 55% and 84% at 25 and 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectively ( $p < 0.0001$ ). Furthermore, SDZ+PYR reduced intracellular proliferation ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 3B**).

In agreement with the previous finding, representative images obtained by light microscopy demonstrate that BeWo cells infected without treatment have many intracellular tachyzoites (**Figure 4A**). In cells treated with SDZ+PYR, a reduction in the number of tachyzoites was observed compared to the untreated control (**Figure 4B**). Representative images at concentrations of 6.2, 12, 25, and 50  $\mu\text{g/mL}$  showed a proportional reduction in the number of parasites and treatment concentration in BeWo cells (**Figure 4C-F**).



**Figure 3. Treatment with OEO promotes a reduction in infection rate and proliferation of intracellular tachyzoites.** BeWo cells infected with *T. gondii* tachyzoites were treated with OEO for 24 h (6.2, 12, 25, and 50  $\mu\text{g/mL}$ ), and infection (A) and proliferation (B) indices were calculated. SDZ+PYR positive control (25 and 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectively). Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significant differences from negative control \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ).



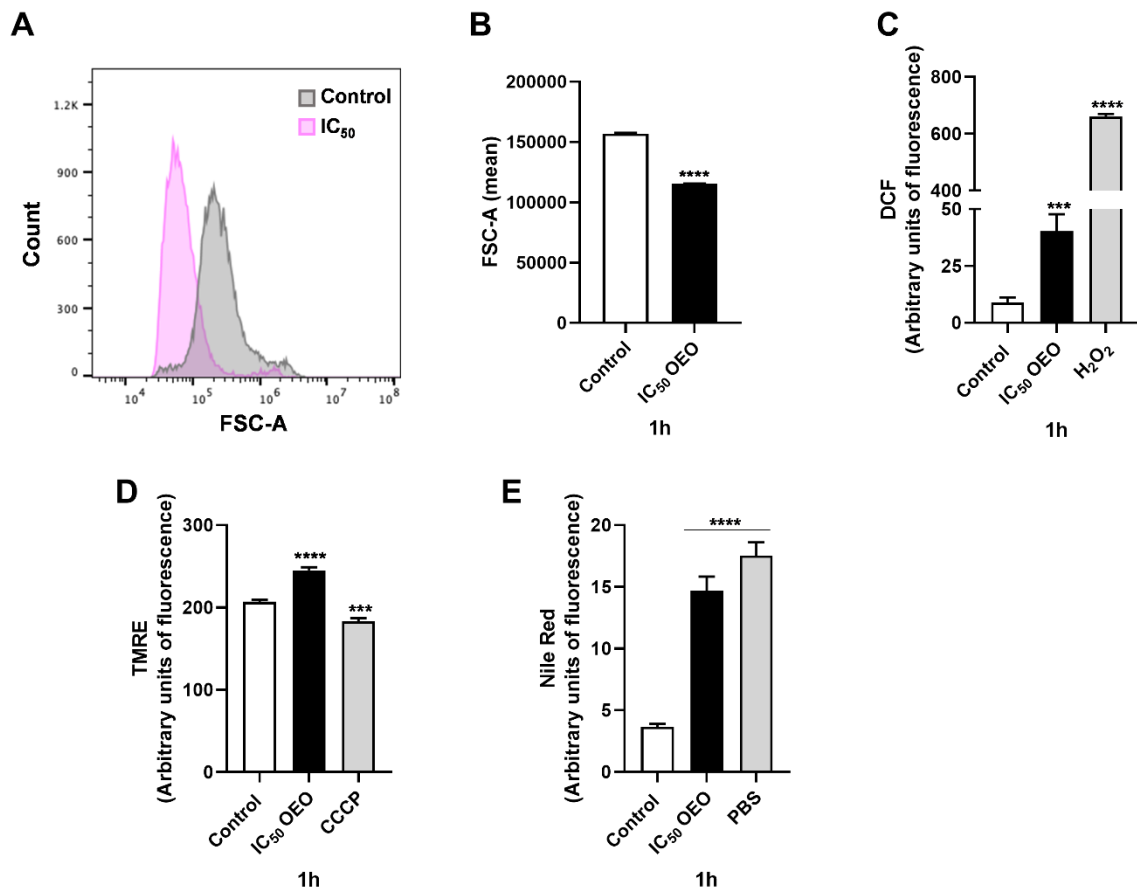
**Figure 4. Photomicroscopy of experimental infection with and without treatment, stained with toluidine blue.** Negative control of BeWo cells infected with *T. gondii* tachyzoites and cultured in RPMI 1640 medium (A). SDZ+PYR positive control (50 and 25 µg/mL, respectively) (B). BeWo cells infected with *T. gondii* and treated with OEO at concentrations of 6.2 µg/mL (C), 12 µg/mL (D), 25 µg/mL (E) and 50 µg/mL (F). Arrows indicate tachyzoites. Magnification of 1000x.

### **3.5 Direct treatment of tachyzoites with OEO reduces cell size, increases ROS production, depolarizes the mitochondrial membrane, and induces the accumulation of neutral lipid droplets**

Initially, it was verified that the treatment with IC<sub>50</sub> of OEO for 1 h reduced the cell volume of tachyzoites ( $p < 0.0001$ ) (Figure 5A-B), indicating morphological alterations in the parasites. In order to understand the mechanisms of direct action that induce the elimination of the parasites, we investigated the metabolic pathways after treatment with IC<sub>50</sub> for 1 h.

Firstly, the levels of ROS in tachyzoites were evaluated, and it was observed an increase of more than 30 times in relation to the control group of *T. gondii* ( $p < 0.0019$ ) (Figure 5C). Then, when  $\Delta\Psi_m$  was evaluated, it was observed that the treatment caused depolarization in this organelle ( $p < 0.0001$ ) (Figure 5D). Finally, the OEO treatment promoted the accumulation of intracellular lipid bodies more than 5 times compared to the control ( $p < 0.001$ ) (Figure 5E). These data together are

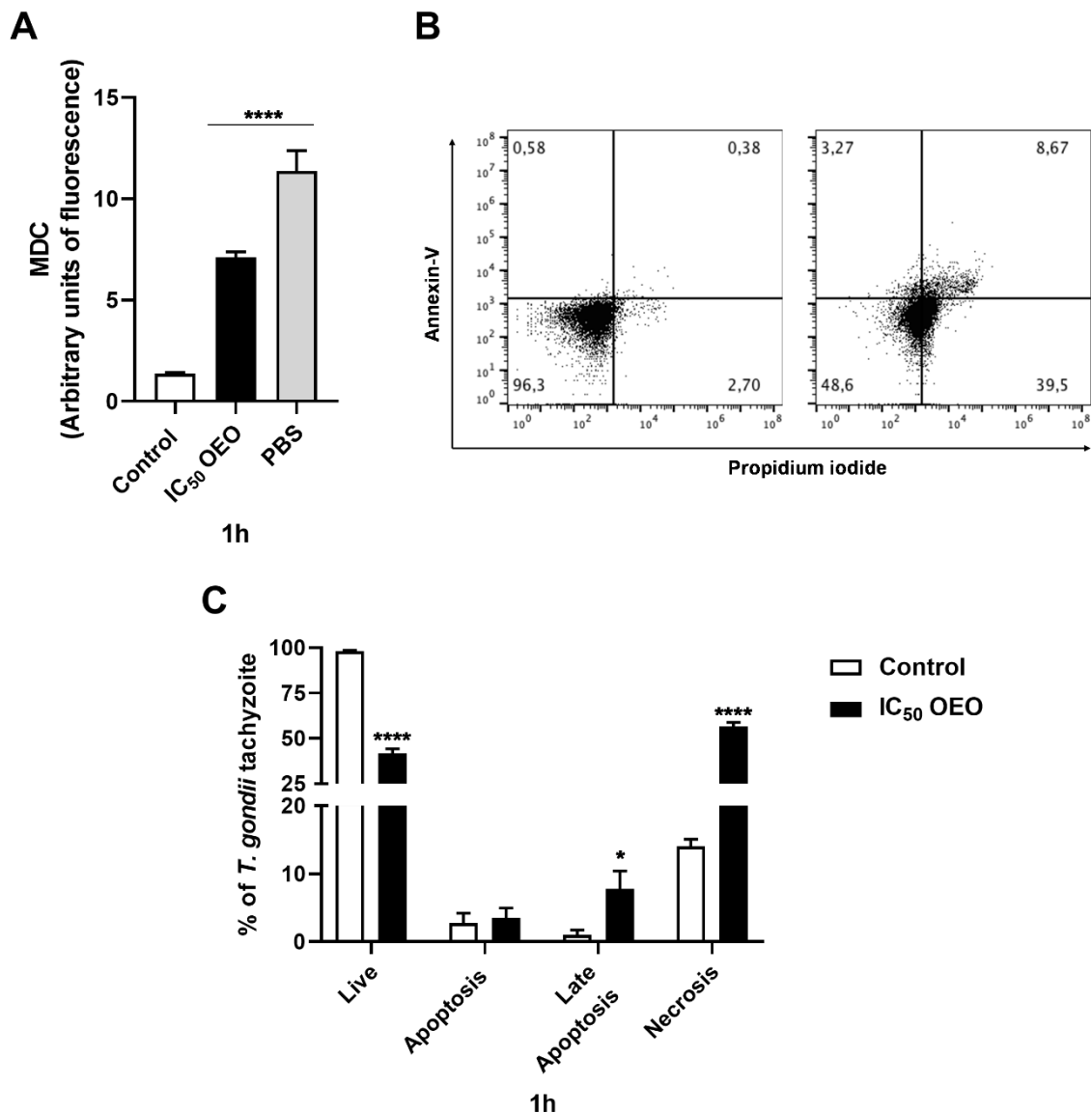
suggestive of metabolic stress in the parasite.



**Figure 5. Treatment with OEO promotes a decrease in cell volume and metabolic stress.** *T. gondii* tachyzoites were treated with OEO for 1 h with IC<sub>50</sub>. Cell volume in OEO treated *T. gondii* tachyzoites, typical histogram plotted (**A**). bar graph (**B**). FSC-A were considered a function of cell size. Colorimetric analysis ( $\Delta\Psi_m$ ) by TRME (**C**); Determination of total ROS (**D**); Labeling of lipid droplets by Nile red (**E**). (C and E normalized by the number of cells). Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significant differences between the negative control \*\*\* ( $p < 0.0005$ ) and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ).

### 3.6 OEO promotes the elimination of tachyzoites by autophagic process and plasma membrane permeabilization

In order to distinguish the types of death involved in the elimination of tachyzoites, evaluation of the induction of autophagy, apoptosis, and necrosis after the treatment with IC<sub>50</sub> for 1 h was performed. It showed an increase in the intensity of labeling with monodansylcadaverine ( $p < 0.0001$ ), a process suggestive of autophagy (**Figure 6A**). Subsequently, the treated parasites showed PI+ labeling of 39.5%, indicating plasma membrane permeabilization, and 8.67% showed double labeling by AN+ PI+ ( $p < 0.04$ ), suggesting a late death process similar to apoptosis. The AN+ labeling did not differ from the control group (**Figure 6B-C**).

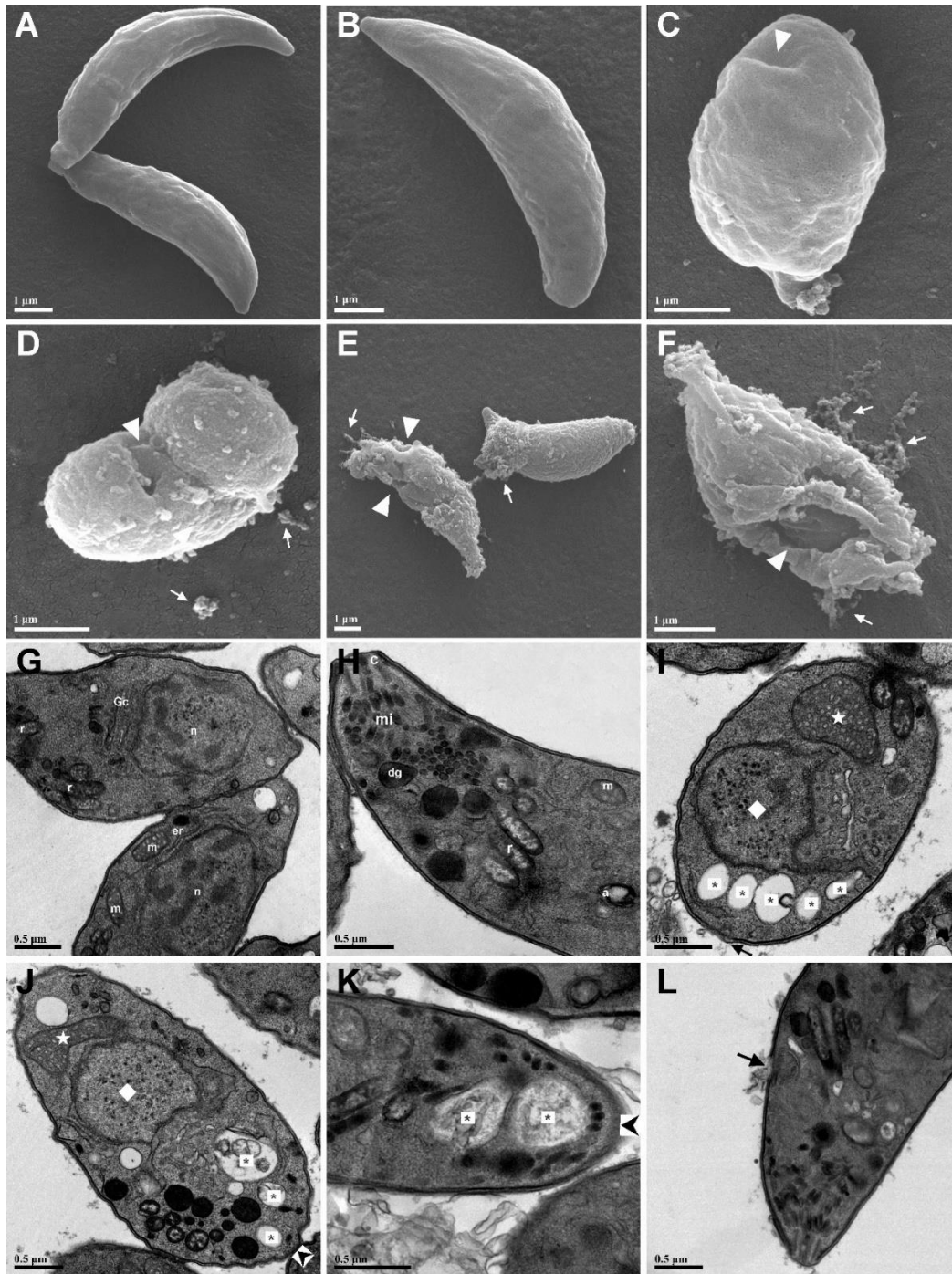


**Figure 6. Mechanisms related to the death process in OEO-treated tachyzoites.** *T. gondii* tachyzoites were treated with OEO for 1 h with IC<sub>50</sub>. Fluorimetric analysis of autophagy with monodansylcadaverine probe, normalized by cell number (A). Representative histogram of phosphatidylserine (annexin V) exposure and plasma membrane permeabilization (propidium iodide) analysis. (B) Bar graph (C). (A normalized by the number of cells). Values represent the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significant differences from the negative control \*\*\*\* (p 0.0001) and \* (p<0.04).

### 3.7 OEO treatment causes alteration in the morphology and ultrastructure of tachyzoites

SEM and TEM analyses indicated that untreated tachyzoites have an elongated body, smooth cell membrane, preserved cell extension, and intact

organelles (**Figure 7A-B**). However, after treatment with OEO IC<sub>50</sub>, it was possible to observe leakage of cytoplasmic content, damage to the plasma membrane, and reduction of cell volume (**Figure 7C-F**). TEM also showed intact organelles and plasma membrane and preserved apical region in untreated parasites (**Figure 7G-H**). In contrast, treated tachyzoites showed disorganization of cytoplasmic organelles, including the apical complex, mitochondrial swelling, and autophagic vacuoles (**Figure 7I-K**). It was also possible to observe plasma membrane rupture and leakage of cell contents (**Figure 7L**).



**Figure 7. Morphological and ultrastructural changes caused by OEO treatment in *T. gondii* tachyzoites.** Scanning electron microscope images (A-F): untreated tachyzoites (A-B), parasites treated with OEO IC<sub>50</sub> (C-F). Transmission electron microscopy images (G-L): untreated tachyzoites (G-H), parasites treated with OEO IC<sub>50</sub> (I-L). Apicoplast (a), conoid (c), dense granule (dg), endoplasmic reticulum (er), Golgi complex (Gc), mitochondria (m), microneme (mi), nucleus (n), rhoptry (r), vacuole autophagy (\*), mitochondrial swelling (★), nuclear alteration (◆), leakage of cytoplasmic content (white arrow), plasma membrane damage (white arrowhead and black arrow), disorganization of the apical complex (▶). Scale bars = 1 μm (A-F), 0.5 μm (G-L).

## 4 Discussion

The ideal drug for the treatment of congenital toxoplasmosis should have little or no toxicity to the host cell, distribution in the main sites of fetal infection, freedom from fetal toxicity, and teratogenic effects. However, no drug currently used in the human treatment of toxoplasmosis meets all these criteria (Derouin et al., 2008; Elsheikha, 2008; Barbosa et al., 2015).

In the present study, low cytotoxicity was observed in BeWo trophoblastic lineage cells *in vitro*. Previous studies showed similar results using species of the genus *Origanum* at similar concentrations in Vero (green monkey kidney) and THP-1 (human monocyte) (Hajlaoui et al., 2016; Akkaoui et al., 2020), indicating the low cytotoxicity of essential oils isolated from plants of the genus *Origanum*. On the other hand, OEO acts directly on tachyzoites, leading to a pronounced toxoplasmicidal effect. Yao et al. (2021) found similar results, indicating reduced viability of *T. gondii* tachyzoites after OEO treatment. Carvacrol and thymol present in thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) also appeared to be responsible for a 24% decrease in tissue cysts in brain and retina in Swiss albino mice infected with strain Me49 (ERAKY et al., 2016).

We know that effective concentrations against the parasite should not demonstrate a deleterious effect on host cells. In addition, the calculation of SI in the search for alternative compounds is relevant due to the predictive value of indicating the selectivity of the treatment concerning the parasite/host relationship (Miranda-Sapla et al., 2019). Deng et al. (2020) postulate that as higher the SI value by *in vitro* tests, the better the effect of this compound against *T. gondii* is achieved. However, there is no consensus on the literature concerning reference values for *T. gondii*, as observed for other parasites such as *Leishmania* (Don and Ioset, 2014). Despite the scarcity of parameters, we consider our indexes high compared to a previous study, where the best anti-*T. gondii* potential without causing damage to cells was achieved at levels above 6.44 (Deng et al., 2020); thus, our treatment was 9.18 times more selective to the parasite in relation to the host.

We found a reduction in the number of infected cells and inhibition of intracellular proliferation in BeWo cells treated and experimentally infected with *T. gondii*. Infection by *Cryptosporidium parvum*, a parasite also belonging to the phylum Apicomplexa, in HTC-8 cells (human lineage of adenocarcinoma of the large

intestine) also showed a reduction in infection after treatment with OEO (Gaur et al., 2018). We believe that due to the variety of components of a lipophilic nature presented by essential oils, there is an advantage in accessing and targeting intracellular microorganisms. This is due to the easy absorption by the cell membrane, allowing OEO to access intracellular parasites without causing damage to eukaryotic host cells (García et al., 2017; Tasdemir et al., 2019). In addition, Yao et al. (2021) suggest that carvacrol, an active component of OEO, may limit the movement capacity of tachyzoites and inhibit invasion-related proteins.

Due to the ability of OEO to alter metabolic and cytoplasmic pathways in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* (Santoro et al., 2007, Tomiotto-Pellissier et al., 2022), we investigated mechanisms underlying the direct action on tachyzoites. Because *T. gondii* and other parasites belonging to the phylum Apicomplexa have single mitochondria, maintaining the integrity of this organelle is critical for metabolic survival processes (Garbuz; Arrizabalaga, 2017; Goodman et al., 2017). Our results showed that OEO treatment reduces tachyzoite cell size. A recent study indicated, by SEM analysis, that treatment with OEO or carvacrol on *T. gondii* tachyzoites induces morphological changes such as a decrease in tachyzoites and curling from the posterior to the anterior region, suggestive of damage to mobility and infectivity (Yao et al., 2021).

We observed depolarization of the mitochondrial membrane, an increase in the total ROS levels, and mitochondrial swelling on tachyzoites treated directly with OEO. Similarly, Yao et al. (2021) indicate that carvacrol has activity on mitochondrial potential, releasing cytochrome c. Predictive analysis *in silico* showed that OEO could accumulate in mitochondria (Tomiotto-Pellissier et al., 2022), causing damage to the mitochondrial membrane and increase in ROS, which may initiate a process of cell death (Adeyemi et al., 2017; Hou et al., 2020). Since mitochondria are strongly linked to ROS generation, we established that the collapse of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) is strongly intricate with the generation of total ROS in treated parasites, leading to mitochondrial membrane damage and dysfunction in adenosine triphosphate (ATP) levels (Syn et al., 2017, Alonso et al., 2021). Furthermore, mitochondrial dysfunction is a known inducer of lipid droplet accumulation, a hallmark of cellular stress. Oliveira et al. (2009) also determined the accumulation of lipid bodies, where the lipid profile was substantially altered in

*Leishmania chagasi* promastigotes treated with different essential oils. Thus, we indicate that the change in the lipid profile of parasites treated with OEO may result from the direct interference of the treatment in lipid biosynthesis pathways due to metabolic stress.

Once energy limitation induces rapid and selective degradation of mitochondria in single mitochondria parasites, this degradation culminates in death. In this way, autophagy mediates the cell death process in protozoa of the phylum Apicomplexa triggered by ROS (Ghosh et al., 2012; Filomeni et al., 2015). We believe that OEO treatment is closely related to irreversible cell injuries that culminate in a point of no return, triggering a process of cell death.

By PI labeling and electron microscopy, we observed that the OEO permeabilized the plasma membrane of the treated parasites. This is due to the fact that OEO can diffuse between cell membranes so that OEO components act directly on ATPases, leading to membrane permeabilization and consequently death due to damage in osmoregulation processes, such as ATP leakage, phosphate and potassium ions, and mitochondria permeabilization (Chouhan et al., 2017). Based on these findings, our main hypothesis is that OEO favors the disruption of plasma and mitochondrial membranes, leading to a homeostatic imbalance in tachyzoites and the death of the parasites.

Thus, our study demonstrates that OEO treatment has anti-*T. gondii* activity, with greater selectivity to the parasite and low cytotoxicity to host cells, and permeabilization of the parasite plasma membrane, culminating in the death of the parasite due to metabolic changes. Moreover, this is the first study that showed the activity of OEO on *T. gondii* in cells of trophoblastic origin. These results may contribute to future investigations and the possibility of OEO becoming a therapeutic alternative for congenital toxoplasmosis.

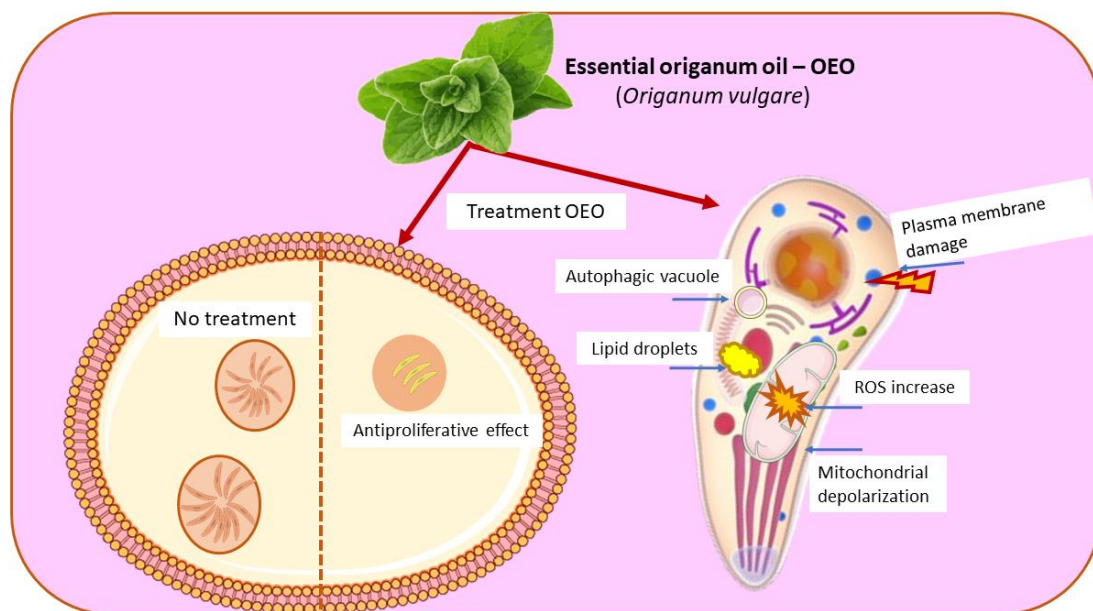


Figure 8. Graphical abstract of main results obtained.

### Financial support

This work had financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and Government of the State of Paraná, Brazil.

## REFERENCES

- Adeyemi, O.S., Murata, Y., Sugi, T., Kato, K. 2017. Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. **International Journal of Nanomedicine**. 12, p. 1647-1661. DOI: 10.2147/IJN.S122178
- Aguirre, A.A., Longcore, T., Barbieri, M., Dabritz, H., Hill, D., Klein, P.N., Lepczyk, C., Lilly, E.L., McLeod, R., Milcarsky, J., Murphy, C.E., Su, C., VanWormer, E., Yolken, R., Sizemore, G.C. 2019. The one health approach to toxoplasmosis: Epidemiology, control, and prevention strategies. **Ecohealth**. 16(2), p. 378-390. DOI: 10.1007/s10393-019-01405-7.
- Alonso, L., de Paula, J.C., Baréa, P., Sarragiotto, M.H., Ueda-Nakamura, T., Alonso, A., de Souza, F.N., Lancheros, C.A.C., Volpato, H., Lazarin-Bidóia, D., Nakamura, C.V. Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of  $\beta$ -carboline derivatives. **Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes**. 1863(1) p. 183473. DOI: 10.1016/j.bbamem.2020.183473. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32937102.
- Akkaoui, S., Johansson, A., Yagoubi M., Haubek, D., El Hamidi, A., Rida, S., Claesson, R., Ennibi, O. 2020. Chemical composition, antimicrobial activity, *in vitro* cytotoxicity and leukotoxin neutralization of essential oil from *Origanum vulgare* against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Pathogens (Basel, Switzerland)**. 9(3), p.192. DOI: 10.3390/pathogens9030192.
- Barbosa, M.A., Angelin, L.G., Saikawa, G.I.A., De Oliveira, C.J.C., Da Silva, S.S., Vendruscolo, J.W., Marinello, P.C., Fujita, T.C., Da Rocha, S.P.D., Watanabe, M.A.E., Mitsuka-Bregano, R., Costa, I. 2015. Potenciais alternativas terapêuticas em estudo para a toxoplasmose congênita: Uma revisão bibliográfica. **Revista de Patologia Tropical**. 44(1), 1-11. DOI: 10.5216/rpt.v44i1.34798.
- Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**. 17(4), 3989–4006. DOI: 10.3390/molecules17043989.
- Bortoleti B.T.S., Gonçalves, M.D., Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M.M., Assolini, J.P., Carloto, A.C.M., de Carvalho, P.G.C., Cardoso, I.L.A., Simão, A.N.C.,

Arakawa, N.S., Costa, I.N., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W.R. 2018. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. **Phytomedicine**. 46, 11-20. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.06.010.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, setembro 2018. Available in: < <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>>. Access in em: 23 march 2022.

Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S., 2017. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicine**. 4(3), p. 58. DOI: 10.3390/medicines4030058.

Deng, H., Huang, X., Jin, C., Jin, C.M., Quan, Z.S. 2020. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of dihydroartemisinin derivatives with potential anti-*Toxoplasma gondii* agents. **Bioorganic Chemistry**. 94, p. 103467. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103467.

Derouin, F., Pelloux H. 2008 Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**. 14(12), 1089-1101. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02091.x.

Don, R., Ioset, J. 2014. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**. 141(1), 140-146. doi:10.1017/S003118201300142X.

Ebani, V.V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Pistelli, L., Mancianti, F. 2018 Antimicrobial activity of five essential oils against bacteria and fungi responsible for urinary tract infections. **Molecules**. 23(7), p.1668. DOI: 10.3390/molecules23071668.

Elazab, S.T., Soliman, A.F., Nishikawa, Y. 2021. Effect of some plant extracts from Egyptian herbal plants against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 83(1), 100-107. DOI: 10.1292/jvms.20-0458.

Elsheikha, H.M., 2008. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**. 122(4), 335-353. DOI: 10.1016/j.puhe.2007.08.009.

Eraky, M.A., El-Fakahany, A.F., El-Sayed, N.M., Abou-Ouf, E.A., Yaseen, D.I. 2016.

Effects of *Thymus vulgaris* ethanolic extract on chronic toxoplasmosis in a mouse model. **Parasitology Research**. 115, 2863–2871. DOI: 10.1007/s00436-016-5041-2

Filomeni, G.D., de Zio, F.C. 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death & Differentiation**. 22(3) p. 377-388. DOI: 10.1038/cdd.2014.150.

Fujisaki, R., Fujisaki, R., Kamei, K., Yamamura, M., Nishiya, H., Inouye, S., Takahashi, M., Abe, S. 2012. *In vitro* and *in vivo* anti-plasmodial activity of essential oils, including hinokitiol. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 43(2), 270-279. PMID: 23082579.

Garbuz, T., Arrizabalaga, G., 2017. Lack of mitochondrial MutS homolog 1 in *Toxoplasma gondii* disrupts maintenance and fidelity of mitochondrial DNA and reveals metabolic plasticity. **PLoS One**. 12(11), e0188040. DOI: 10.1371/journal.pone.0188040.

García, M., Scull, R., Satyal, P., Setzer, W.N, Monzote L. 2017. Chemical characterization, antileishmanial activity, and cytotoxicity effects of the essential oil from leaves of *Pluchea carolinensis* (jacq.) G. Don (Asteraceae). **Phytotherapy Research**. 31(9):1419-1426. DOI: 10.1002/ptr.5869.

Gaur, S., Kuhlenschmidt, T.B., Kuhlenschmidt, M.S., Andrade, J.E. 2018. Effect of oregano essential oil and carvacrol on *Cryptosporidium parvum* infectivity in HCT-8 cells. **Parasitology International**. 67(2), 170-175. DOI: 10.1016/j.parint.2017.11.001.

Goodman, C.D., Buchanan, H.D., McFadden, G.I. 2017. Is the mitochondrion a good malaria drug target? **Phytotherapy Research**. 33(3), 185-193. DOI: 10.1016/j.pt.2016.10.002.

Ghosh, D., Walton, J.L., Roepe, P.D., Sinai, A.P. 2012. Autophagy is a cell death mechanism in *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**. 14(4), 589-607. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01745.x.

Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., Kadri, A. 2016. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil.

**Microbial Pathogenesis.** 95, 86-94. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.03.003.

Hou, H., Zhang, X., Zhao, T., Zhou, L. 2020. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. **PeerJ.** 8, p. e9626. DOI: 10.7717/peerj.9626.

Lombrea, A., Antal, D., Ardelean, F., Avram, S., Pavel, I.Z., Vlaia, L., Mut. A.M., Diaconeasa, Z., Dehelean, C.A., Soica, C., Danciu, C.A. 2020. A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. **International Journal of Molecular Sciences.** 21(24), p.9653. DOI: 10.3390/ijms21249653.

Machado, L.F., Sanfelice, R.A., Bosqui, L.R., Assolini, J.P., Scandorieiro, S., Navarro, I.T., Depieri-Cataneo, A.H., Wowk, P.F., Nakazato, G., Bordignon, J., Pavanelli, W.R, Conchon-Costa, I., Costa, I.N. 2020. Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of *Toxoplasma gondii* RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction. **Experimental Parasitology.** 211, p.107853. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.107853.

Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N.A., Echard, B.W., Bagchi, D., Preuss, H.G. 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry.** 228(1-2), 111-117. DOI: 10.1023/a:1013311632207.

Miranda-Sapla, M.M., Tomiotto-Pellissier, F., Assolini, J.P., Carloto, A.C.M., Bortoleti, B.T.D.S., Gonçalves, M.D., Tavares, E.R., Rodrigues, J.H.D.S., Simão, A.N.C., Yamauchi, L.M., Nakamura, C.V., Verri, W.A.Jr., Costa, I.N., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W.R. 2019. Trans-Chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **The European Journal of Pharmacology.** 853, 275-288. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.03.049.

Meneceur, P., Bouldouyre, M.A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., Garin, J.F., Derouin, F. 2008. *In vitro* susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 52(4), 1269–1277. DOI: 10.1128/AAC.01203-07.

Moghrovyanyan, A., Sahakyan, N., Babayan, A., Chichoyan, N., Petrosyan, M., Trchounian, A. 2019. Essential oil and ethanol extract of Oregano (*Origanum*

*vulgare* L.) from armenian flora as a natural source of terpenes, flavonoids and other phytochemicals with antiradical, antioxidant, metal chelating, tyrosinase inhibitory and antibacterial activity. **Current Pharmaceutical Design**. 25(16), 1809–1816. DOI: 10.2174/1381612825666190702095612.

Montoya, JG., Remington, JS., 2008. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of the Infectious Diseases Society of America**. 47(4), 554–566. DOI: 10.1086/590149.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 65 (1-2) 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Nishi, L., Sanfelice, R.A.S., Bortoleti, B.T.S., Tomiotto-Pellissier, F., Silva, T.F., Evangelista, F.F., Lazarin-Bidóia, D., Costa, I.N., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., Baptista, A.T.A., Bergamasco, R., Falavigna-Guilherme, A.L. 2021. Moringa oleifera extract promotes apoptosis-like death in *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. **Parasitology**, 148(12), p. 1447-1457. DOI:10.1017/S0031182021001086.

Oliveira, V.C.S., Moura, D.M., Lopes, J.A., de Andrade, P.P., da Silva, N.H., Figueiredo, R.C. 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **journal Parasitology Research**. 104(5), 1053–1059. DOI: 10.1007/s00436-008-1288-6.

Peyron, F., Leod, Mc R., Ajzenberg, D., Contopoulos-Ioannidis, D., Kieffer, F., Mandelbrot, L., Sibley, L.D., Pelloux, H., Villena, I., Wallon, M., Montoya, J.G. 2017. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: one parasite, two diverging approaches. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 11(2), p. e0005222. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005222.

Sanfelice, R.A., da Silva, S.S., Bosqui, L.R., Miranda-Sapla, M.M., Barbosa, B.F., Silva, R.J., Ferro, E.A.V., Panagio, L.A., Navarro, I.T., Bordignon, J., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W.R., Almeida, R.S., Costa, I.N. 2017. Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. **Acta Tropica**. 167, 208-215. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.12.006.

Sanfelice, R.A., Bortoleti, B.T.D.S., Tomiotto-Pellissier, F., Silva, T.F., Bosqui, L.R., Nakazato, G., Castilho, P.M., de Barros, L.D., Garcia, J.L., Lazarin-Bidóia, D., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W.R., Costa, I.N. 2021. Biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio) reduce *Toxoplasma gondii* infection and proliferation in HeLa cells, and induce autophagy and death of tachyzoites by apoptosis-like mechanism. **Acta Tropica**. 222, p.106070. DOI: 10.1016/j.actatropica.2021.106070.

Santoro, G.F., das Graças, C.M., Guimarães, L.G., Salgado, A.P., Menna-Barreto, R.F., Soares, M.J. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**. 100(4), 783-790. DOI: 10.1007/s00436-006-0326-5.

Scandorieiro, S., de Camargo, L.C., Lancheros, C.A., Yamada-Ogatta, S.F., Nakamura, C.V., de Oliveira, A.G., Andrade, C.G., Duran, N., Nakazato, G., Kobayashi, R.K. 2016. Synergistic and additive effect of Oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**. 7, p.760. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00760.

Smith, NC., Goulart, C., Hayward, J.A., Kupz, A., Miller, C.M., van Dooren, G.G. 2021. Control of human toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**. 51(2-3), 95-121. DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.11.001.

Syn, G., Anderson, D., Blackwell, J.M., Jamieson, S.E. 2017. *Toxoplasma gondii* infection is associated with mitochondrial dysfunction *in-vitro*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 12(7), p. 512. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00512

Tasdemir, D., Kaiser, M., Demirci, B., Demirci, F., Baser., K.H.C. 2019. Antiprotozoal activity of turkish *Origanum onites* essential oil and its components. **Molecules**. 24(23), p. 4421. DOI: 10.3390/molecules24234421.

Tomiotto-Pellissier, F. Alves, D.R., Miranda-Sapla, M.M., de Moraes, S.M., Assolini, J.P., Bortoleti, B.T.D.S., Gonçalves, M.D., Cataneo, A.H.D., Kian, D., Madeira, T.B., Yamauchi, L.M., Nixdorf, S.L., Costa, I.N., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W.R. 2018. *Caryocar coriaceum* extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion. **Biomedicine &**

**Pharmacotherapy**. 98, pp. 662-672. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.083.

Tomiotto-Pellissier, F., da Silva Bortoleti, B.T., Concato, V.M., Ganaza, A.F.M., Quasne, A.C., Ricci, B., Dolce e Carvalho, P.V., Colleta, G.H.D., Lazarin-Bidóia, D., Silva, T.F., Gonçalves, M.D., Kobayashi, R.K., Nakazato, G., Costa, I.N., Conchon-Costa, I., Miranda-Sapla, M.M., Pavanelli, W.R. 2022. The cytotoxic and anti-leishmanial activity of Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: An in vitro, in vivo, and in silico study. **Industrial Crops and Products**, 187, 115367. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115367.

Yao, N., Xu, Q., He, J.K., Pan, M., Hou, Z.F., Liu, D.D., Tao, J.P., Huang, S.Y. 2021. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil and its active ingredients as potential drugs for the treatment of toxoplasmosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 11, p.793089. DOI: 10.3389/fcimb.2021.793089.

#### **4 CONCLUSÃO GERAL**

Nosso estudo demonstrou que OEO possui atividade toxoplasmicida direcionando a morte do parasito por alterações metabólicas, como permeabilização da membrana plasmática, despolarização de mitocôndria, acúmulo de ERO total, culminando em formação de gotículas lipícas e corpos autofágico, sem causar toxicidade às células eucarióticas. Desta forma, trazemos que o OEO é um composto promissor em uma possível alternativa de tratamento para toxoplasmose congênita.