



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

YASMIN MUNHOZ DOS SANTOS

**AÇÃO ANTI-TOXOPLASMA DO ÁCIDO CAFEICO EM
MODELO DE INFECÇÃO CONGÊNITA *IN VITRO***

Londrina
2022

YASMIN MUNHOZ DOS SANTOS

**AÇÃO ANTI-TOXOPLASMA DO ÁCIDO CAFEICO EM
MODELO DE INFECÇÃO CONGÊNITA *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Experimental, Centro de CiênciasBiológicas, Da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. 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

S237a Santos, Yasmin Munhoz.
Ação antiproliferativa do ácido cafeico em modelo in vitro de infecção congênita por *Toxoplasma gondii* / Yasmin Munhoz Santos. - Londrina, 2022. 57 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. infecção congênita - Tese. 3. ácido cafeico - Tese. 4. *toxoplasma gondii* - 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

YASMIN MUNHOZ DOS SANTOS

**AÇÃO ANTI-TOXOPLASMA DO ÁCIDO CAFEICO EM
MODELO DE INFECÇÃO CONGÊNITA *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Experimental, Centro de CiênciasBiológicas, Da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Raquel Arruda da Silva Sanfelice
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina 18, de agosto de 2022.

AGRADECIMENTOS

Esses anos de mestrado não foram fáceis, foram dias de muito esforço, medos, ansiedade, lágrimas, mas também de muitas alegrias e vitórias.

Começo agradecendo a Deus e a Nossa Senhora Aparecida que me iluminaram, me guiaram, me deram sabedoria e força durante todo esse período e não me deixaram desistir.

Obrigada Pai por me guiar até aqui, eu acredito, confio e me entrego a todos seus planos para minha vida.

A toda minha família, em especial aos meus pais José Francisco e Agda e ao meu irmão Pedro, que mesmo à distância sempre estão comigo, me incentivando, me consolando, vibrando com as minhas alegrias e fazendo o possível para que eu realize todos os meus sonhos, obrigada por todo esforço, dedicação e pelo imenso amor que vocês têm por mim. À vocês sou grata a tudo que sou e por tudo que alcancei, vocês são a parte mais importante da minha vida, e essa conquista também pertence a vocês.

Ao meu noivo Guilherme, por todo amor, carinho, compreensão, por me acalmar nos dias difíceis dessa caminhada e sempre estar do meu lado me dizendo que tudo ficaria bem, você é o meu maior incentivador. Obrigada por todo apoio e compreensão. Obrigada por permanecer ao meu lado e ser meu porto seguro, eu te amo e quero sempre compartilhar todas as minhas conquistas com você.

A minha orientadora Profa. Dra. Idessania, uma pessoa muito especial que me acolheu com todo amor e carinho e não mediu esforços para que eu conseguisse concluir com sucesso meu trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, pela dedicação, por todo incentivo, apoio, pelos conselhos valiosos e por ter sempre confiado e acreditado em mim, te levarei pra sempre em um lugar muito especial no meu coração.

Aos meus amigos, em especial Juliana e Angélica. Minhas maiores companheiras durante todo esse trajeto, realmente as considero como

irmãs, vocês foram presentes que ganhei e que quero levar pra toda vida. Obrigada pela parceria, pelas conversas e risadas, por toda ajuda, por sempre torcer por mim, eu amo vocês! Meu grande agradecimento a todos meus outros amigos do laboratório LIDNC, Ellen, Mariana, Ana Carolina, Amanda, Taylon, Fabrício, Elaine, Bruna, Sara, Manoela, vocês tornaram a caminhada muito mais leve, divertida, me ensinaram, me incentivaram e ajudaram muito, sempre dispostos a fazer o que fosse preciso para que esse trabalho fosse realizado da melhor maneira, eu sou eternamente grata a cada um de vocês e vou levar um pouquinho de cada um pra sempre comigo. Em especial agradeço a Raquel, que desde o início me abraçou, se dedicou a me ensinar tudo que sabia sem medir esforços, obrigada por toda ajuda, pelas conversas, conselhos, pelo carinho que teve comigo, você sem dúvida foi fundamental para a realização desse projeto. Gostaria de fazer um agradecimento especial também a Virgínia, que me acompanhou e me auxiliou em grande parte desse trabalho, obrigada por todo tempo dedicado à mim, por toda paciência em me ensinar com tanto carinho, você foi muito especial.

Aos professores Wander Rogério Pavanelli, Ivete Conchon-Costa, Danielle Lazarin-Bidóia e Larissa Bosqui, obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, auxílio, incentivo e carinho que me proporcionaram durante todo esse período.

Especialmente ao professor Wander, o qual eu tive maior contato durante o mestrado, agradeço pelas conversas e conselhos durante momentos que me senti perdida, foi muito importante para mim. Muito obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia, em especial, Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro e Guilherme de Souza, e ao Dr. João Luís Garcia do Laboratório de Protozoologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, nossos parceiros e sem dúvida essenciais para realização desse trabalho.

Por fim agradeço a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram durante esse período e contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

RESUMO

SANTOS, Yasmin Munhoz. **Ação antiproliferativa do ácido cafeico em modelo *in vitro* de infecção congênita por *Toxoplasma gondii***. 2022. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Toxoplasmose é a infecção causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que assume caráter grave em indivíduos imunocomprometidos, na toxoplasmose ocular e principalmente em casos de infecção congênita. O tratamento da toxoplasmose é dificultado pela toxicidade apresentada pelos fármacos convencionais, sulfadiazina e pirimetamina, e por isso, outros compostos vêm sendo avaliados como tratamento alternativo para esta infecção. O ácido cafeico é um composto fenólico, encontrado em abundância em muitas plantas e alimentos com comprovados efeitos antimicrobiano, antioxidante, anti-*Leishmania* e anti-tripanosossomal. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-proliferativo, imunológico, bem como os mecanismos envolvidos no processo de morte de formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) e na infecção de células trofoblásticas extravilosas HTR8/Svneo utilizando ácido cafeico. Para isso, foi avaliada a citotoxicidade do tratamento com AC em células HTR8/SVneo pelo ensaio de resazurina. A viabilidade dos taquizoítas foi realizada utilizando método de exclusão por azul de tripan. A atividade antiproliferativa do tratamento com AC foi determinada pelos índices de infecção e proliferação intracelular do parasito e confirmados também pela microscopia ótica. Os mecanismos envolvidos na morte do parasito analisados foram, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), potencial de membrana mitocondrial e gotículas lipídicas. Apoptose e permeabilização da membrana plasmática foram avaliados através da marcação com Anexina-V e iodetode propídeo, além de autofagia por monodansilcadaverina. Por fim foi analisada a produção de citocinas pró e antiinflamatórias. Os resultados demonstram que AC não apresenta toxicidade para células HTR8/SVneo e diminui a viabilidade de taquizoítas de *T.gondii*. Houve redução da infecção e da proliferação intracelular, com aumento da produção das interleucinas IL-1 β , MIF e TGF- β . Além disso no parasito foi observado aumento de NO e ERO, despolarização da membrana mitocondrial, formação de gotículas lipídicas e morte sugestiva de apoptose. Ácido cafeico portanto é um potencial candidato para novos estudos que visam o desenvolvimento de terapias para toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: toxoplasmose, infecção congênita, ácido cafeico.

ABSTRACT

SANTOS, Yasmin Munhoz. **Antiproliferative action of caffeic acid in *in vitro* model of congenital infection by *Toxoplasma gondii***. 2022. 58 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

Toxoplasmosis is the infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, which is severe in immunocompromised individuals, in ocular toxoplasmosis and especially in cases of congenital infection. The treatment of toxoplasmosis is hampered by the toxicity presented by the conventional drugs, sulfadiazine and pyrimethamine, and therefore, other compounds have been evaluated as an alternative treatment for this infection. Caffeic acid is a phenolic compound found in abundance in many plants and foods with proven antimicrobial, antioxidant, anti-*Leishmania* and anti-trypanosomal effects. Therefore, the objective of this work was to evaluate the anti-proliferative, immunological effect, as well as the mechanisms involved in the process of death of tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii* (RH strain) and in the infection of HTR8/SVneo extravillous trophoblastic cells using caffeic acid. For this, the cytotoxicity of AC treatment on HTR8/SVneo cells was evaluated by the resazurin assay. The viability of tachyzoites was performed using trypan blue exclusion method. The antiproliferative activity of the AC treatment was determined by the rates of infection and intracellular proliferation of the parasite and also confirmed by light microscopy. The mechanisms involved in the death of the parasite analyzed were levels of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), mitochondrial membrane potential and lipid droplets. Apoptosis and plasma membrane permeabilization were evaluated by labeling with Annexin-V and propidium iodide, in addition to autophagy by monodansylcadaverine. Finally, the production of pro and anti-inflammatory cytokines was analyzed. The results demonstrate that AC does not show toxicity to HTR8/SVneo cells and decreases the viability of *T.gondii* tachyzoites. There was a reduction in infection and intracellular proliferation, with increased production of the interleukins IL-1 β , MIF and TGF- β . In addition, an increase in NO and ROS, depolarization of the mitochondrial membrane, formation of lipid droplets and death suggestive of apoptosis were observed in the parasite. Caffeic acid is therefore a potential candidate for further studies aimed at developing therapies for congenital toxoplasmosis.

Key words: toxoplasmosis; congenital infection; caffeic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CC50	Concentração citotóxica média
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona
CI50	Concentração inibitória média
CO ₂	Dióxido de carbono
DHPS	Dihidropteroato sintase
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
H2DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HTR8/SVneo	Linhagem celular originária de trofoblasto extraviloso
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p40	Subunidade da interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-27	Interleucina 27
INF- γ	Interferon gamma
IS	Índice de Seletividade
MDC	Monodansilcadaverina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NO	Óxido Nítrico
NK	Natural killer
OH	Grupamento hidroxila
PABA	ácido p-aminobenzóico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
SBF	Soro fetal bovino inativado
SDZ+PYR	Sulfadiazina e Pirimetamina
TMRE	Tetrametilrodamina

TNF- α

Fator de necrose tumoral alfa

TGF- β

Fator de transformação do crescimento beta Tregs: Linfócitos T reguladores

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1	TOXOPLASMA GONDII	11
1.1.1	Aspectos Taxonômicos e Morfológicos	11
1.1.2	Ciclo Biológico	13
1.1.3	Patogênese e Epidemiologia da Toxoplasmose	15
1.1.4	Cepas de Toxoplasma Gondii	19
1.1.5	Resposta Imune da Toxoplasmose	20
1.1.6	Diagnóstico e Tratamento da Toxoplasmose	23
1.1.7	Ácido Cafeíco	25
1.1.8	Células Trofoblásticas Extravilosas HTR- 8/Svneo	27
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4	ARTIGO CIENTÍFICO	40
5	CONCLUSÃO GERAL	58

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *TOXOPLASMA GONDII*

1.1.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS E MORFOLÓGICOS

Descoberto em 1908 na Tunísia por Nicolle e Manceaux, o protozoário *Toxoplasma gondii* foi encontrado acidentalmente no tecido de um roedor, *Ctenodactylus gundi*, que era utilizado para pesquisa de leishmaniose no Instituto Pasteur de Tunis (DUBEY, 2020). Inicialmente pensaram se tratar do protozoário causador da leishmaniose, porém logo foi observado que se tratava de um parasito desconhecido que então nomearam de *Toxoplasma gondii* devido a sua morfologia em forma de arco e hospedeiro do qual foi inicialmente isolado (NICOLLE AND MANCEAUX, 1908). No mesmo ano no Brasil, coincidentemente Splendore observou o mesmo parasito em um coelho no Instituto Biológico de São Paulo e também pensou se tratar de *Leishmania* sp., porém também notou que não se tratava de um protozoário conhecido (SPLENDORE, 1908). Desde a sua descoberta até 1937 ocorreu muitos relatos de identificação do parasito em variadas espécies animais incluindo humanos, e só nesse mesmo ano Sabin & Olitsky (1937) fizeram o primeiro estudo detalhado sobre o protozoário (FERGUSON, 2009; DUBEY, 2020).

Toxoplasma gondii é um protozoário, eucarioto, unicelular, pertencente ao supergrupo Alveolata, Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Sarcocystidae, sendo a única espécie do gênero *Toxoplasma* (GOMES, 2020; SMITH, 2021). O parasito possui forma alongada com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de uma banana (REMINGTON et al., 2001; ROBERTGANGNEUX; DARDÉ, 2012). Além de organelas típicas de organismos eucariontes como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndria, *T. gondii* apresenta organelas características, especialmente envolvidas com os processos de adesão e invasão do parasito à célula hospedeira tais como micronemas, roptrias, conóide e grânulos densos, os quais compreendem o complexo apical (BLADER; SAEIJ, 2009; BOUCHUT et al., 2014; MORRISSETTE, 2020).

O complexo apical é um ápice polarizado o qual fazem parte organelas cuja função é coordenar a interação parasito-hospedeiro (MORRISSETTE, 2020).

Micronemas tem forma de bastonete e ficam localizados na extremidade do parasito, atrás do conoide, as roptrias são um grupo de organelas alongadas em formade clava que se estendem de dentro do conóide em direção ao núcleo. Ambas as estruturas são responsáveis pela motilidade, invasão da célula hospedeira e o estabelecimento do vacúolo parasitóforo. Outra organela, cujo formato é esférico, encontrada em toda a célula principalmente na parte posterior do parasito são denominadas grânulos densos, e estão envolvidos na liberação de glicoproteínas que auxiliam na evasão do parasito à resposta imune do hospedeiro. O conóide por sua vez é uma estrutura fibrosa apical, composta por filamentos em forma helicoidal que está envolvido na invasão de células hospedeiras (ZHANG 2019; MORRISSETTE, 2020; SEEBER, 2020).

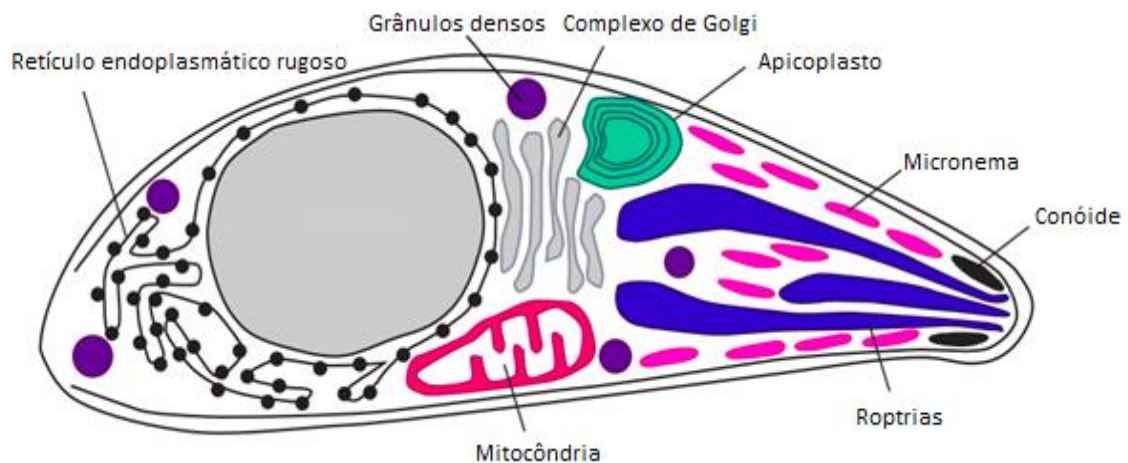


Fig. 1. Ultraestrutura de taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Fonte: Coppens, I.; Joiner, K.A. 2001.

O parasito apresenta três formas evolutivas distintas as quais são denominadas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Taquizoítas são a forma de rápida replicação, característicos da fase aguda da toxoplasmose. Possui estrutura arqueada, medindo aproximadamente 6µm de comprimento por 2µm de largura e possui capacidade de infectar qualquer célula nucleada do corpo, pois expressa uma quantidade maior de proteínas que facilitam a invasão da célula hospedeira (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010; DUBEY, 2020; SMITH, 2021). Devido à sua rápida replicação e à facilidade com que grande número pode ser obtido tanto in vivo como *in vitro*, essa é forma mais utilizada como alvo de estudos (DUBEY, 2020). Além disso essa forma é vulnerável aos fatores de defesa do hospedeiro produzidos pelo sistema imunológico, por isso alguns taquizoítas como forma de defesa ao penetrarem

nas células hospedeiras, se proliferam lentamente, desenvolvendo um metabolismo mais lento, formando o cisto tecidual contendo bradizoítas. Estes cistos podem atingir 300µm de tamanho e conter até 3000 bradizoítas no seu interior. Tais cistos podem estar presentes em qualquer tecido do hospedeiro, porém são mais frequentes nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010; NISHIKAWA et al., 2011).

Oocisto é a forma de resistência encontrada no ambiente, a qual contém esporozoítas, podendo contaminar água, solo e alimentos (AMENDOEIRA, 1995). Estes são excretados nas fezes dos felinos após a reprodução sexuada no intestino desses animais e liberados ainda imaturos (bilhões diariamente) junto com as fezes (KASPER; BOOTHROYD, 1993). Os oocistos não esporulados são ovais e depois de esporulados ou maduros são elípticos e medem de 11 a 14µm. Dependendo da temperatura e oxigenação, a esporulação ocorre em dois ou três dias, porém podem permanecer viáveis por meses ou anos, em diferentes condições de temperatura (-20°C a 37,5°C) e umidade, em águas doces e marinhas (REMINGTON et al., 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; FREPPEL, 2019). Estes apenas são inativados com temperatura superior a 45 °C, além disso outro fator importante que dificulta a eliminação dessa forma é que são muito resistentes a agentes químicos como ácidos, detergentes e desinfetantes, além do tratamento com ozônio que é utilizado pelas indústrias de tratamento de água, o que representa um risco em localidades onde esse tratamento não inclui a filtração (REMINGTON et al., 2001; FREPPEL, 2019). Essa resistência da forma oocística se dá a estrutura da sua parede, formada por dupla camada composta de proteínas e lipídios, conferindo grande capacidade do mesmo em manter essa parede íntegra (FREPPEL, 2019).

1.1.2 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de *Toxoplasma gondii* é heteroxeno e pode se dar de duas formas distintas, fase sexuada, a qual ocorre nas células epiteliais do intestino do hospedeiro definitivo, ou seja, gatos e outros felídeos, e fase assexuada, que ocorre em tecidos do hospedeiro intermediário, ou seja, aves e mamíferos incluindo o homem (MINEO e VITOR, 2016).

Nos felídeos, hospedeiro definitivo, o ciclo se inicia através da ingestão e/ou

contato com qualquer uma das formas do parasito. A ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítas que ocorre através do consumo de carnes cruas ou mal cozidas é geralmente a forma mais comum de acontecer, porém essa infecção também pode se dar através de oocistos contendo esporozoítas por meio do contato com solo contaminado ou através de taquizoítas presentes em secreções orgânicas (WHITE, et al 2014; MINEO e VITOR, 2016; DUBEY, 2020).

Após a ingestão de cistos ou oocistos, a parede cística é digerida por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal desses animais, promovendo a liberação de bradizoítas que então penetram nas células do intestino e se convertem em taquizoítas. Quando ocorre a ingestão de formas taquizoítas livres, no intestino ocorre a penetração direta nas células epiteliais. Já no interior das células epiteliais do intestino se dá início a fase sexuada, a qual ocorre somente nessas células (WHITE, et al 2014; MINEO e VITOR, 2016). Os parasitos começam a se multiplicar por meio do processo de merogonia, reprodução assexuada característica do filo Apicomplexa. Desse processo se dá formação de merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo, esse conjunto recebe o nome de esquizonte maduro (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2004). A etapa sexuada do ciclo se inicia quando ocorre o rompimento da célula infectada com consequente liberação dos merozoítos. Estes penetram em outras células epiteliais e se diferenciam em formas sexuadas masculinas e femininas, que após a maturação formam os gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas). Os microgametas saem das células e fecundam o macrogameta, presente em outras células. Depois da fertilização há formação de uma parede externa envolvendo o zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que é liberado para o meio junto com as fezes dos felídeos, esse oocisto é composto por dois esporocistos contendo quatro esporozoítas em cada quando esporulado. No ambiente com condições ideais de temperatura e umidade tornam-se então esporulados, infectantes (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HUNTER; SIBLEY, 2012; FREPPEL, 2019; DUBEY, 2020).

Os hospedeiros intermediários, como aves e demais mamíferos incluindo o homem, adquirem a infecção pela ingestão dos oocistos esporulados presentes em água e alimentos contaminados, pela ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas, pela ingestão de taquizoítas que podem estar presentes em líquidos biológicos (saliva, leite, esperma); ou ainda, através de transplantes de

órgãos e infecções transplacentárias (KODJIKIAN, 2010; CENCI-GOGA et al., 2011; HUNTER; SIBLEY, 2012; DUBEY, 2020). Uma vez que a forma livre está presente no hospedeiro pode ocorrer a entrada do parasito em qualquer célula nucleada, local onde o parasito forma o vacúolo parasitóforo e se multiplica intensamente por endodiogenia formando novos taquizoítas. Estes rompem as células parasitadas e infectam outras células (MOURA, AMENDOEIRA & BARBOSA, 2009; HUNTER; SIBLEY, 2012).

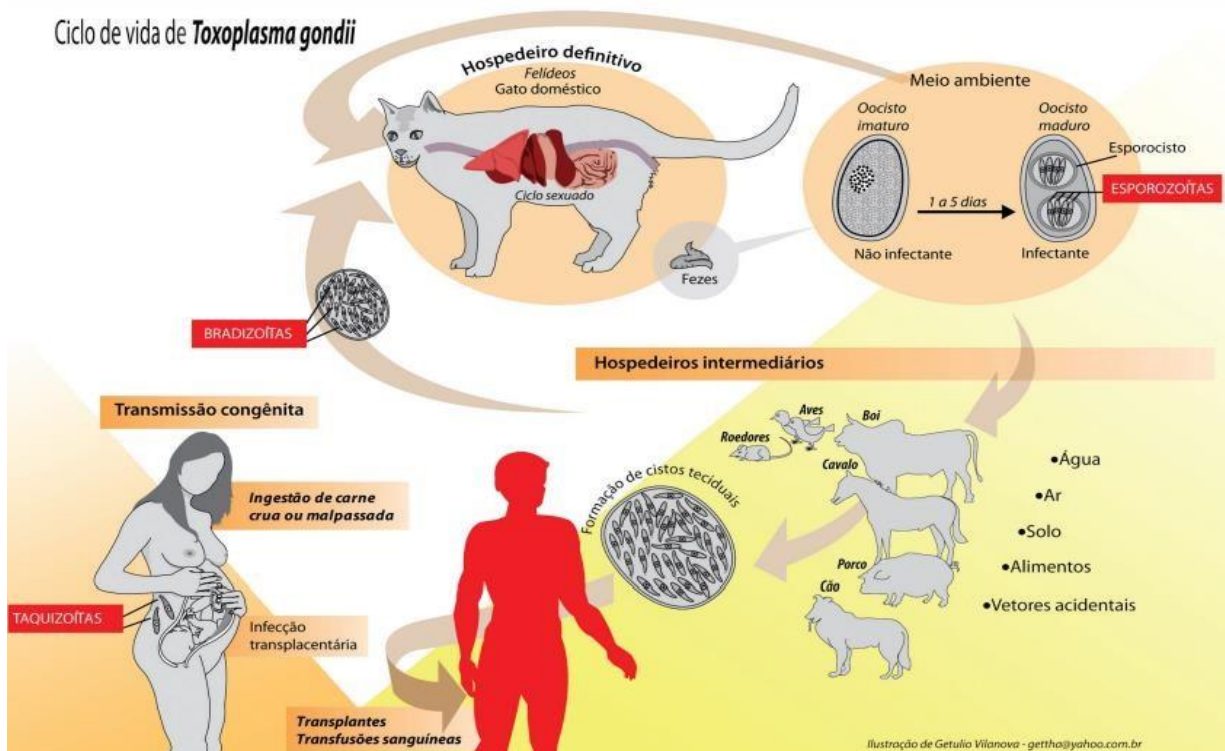


Fig. 2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*: vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos.

Fonte: Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009.

1.1.3 PATOGÊNESE E EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose, infecção ocasionada por *Toxoplasma gondii*, é uma zoonose amplamente distribuída (YBAÑEZ, et.al 2020). A infecção ainda é considerada um problema de saúde pública, isso porque desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos, na toxoplasmose ocular e na infecção congênita (CDC, 2015; DJAKOVIC et al., 2019).

A toxoplasmose ocorre em dois estágios: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda há predomínio de taquizoítas, que se multiplicam rapidamente no interior de células nucleadas, esse processo acaba acarretando a ruptura das células

hospedeiras e se propagam rapidamente para outros tecidos, destruindo-os e podendo causar áreas necróticas focais (DUBEY; JONES, 2008; SMITH et al., 2021). Se essa multiplicação do parasito não for controlada pela resposta imune do hospedeiro, pode ser fatal para o mesmo (VIDAL e PEREIRA-CHIOCCOLA, 2021).

A fase crônica aparece cerca de duas a três semanas após a infecção, quando há o início da produção de citocinas e anticorpos contra muitas proteínas de *T. gondii*. Como mecanismo de proteção os taquizoítas intracelulares se diferenciam em bradizoítos os quais se multiplicam lentamente envolvidos por uma parede cística que confere proteção dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Esses cistos residem preferencialmente nos tecidos neurais, musculares e oculares e, se rompidos, podem levar a reativação em 10-20% de pessoas imunocompetentes podendo causar inflamação e necrose local (VIDAL e PEREIRA-CHIOCCOLA, 2021; BARROS, 2022). No entanto, a maioria deles persiste indefinidamente no cérebro e nos músculos, desenvolvendo imunidade protetora ao longo da vida contra a reinfeção, uma vez que os bradizoítos liberados são normalmente destruídos pela resposta imune do hospedeiro (DUBEY, 2008; BARROS, et al. 2022).

Quando a infecção é sintomática, podem ser observadas manifestações características de fase aguda da infecção, como febre, mialgia, astenia, cefaléia e linfadenopatia; apesar de raras é possível a ocorrência de encefalite, hepatite e pneumonia (ELSHEIKHA, 2008; ATILLA et al., 2015). No entanto, nos indivíduos imunocomprometidos, as manifestações quase sempre ocorrem como resultado da reativação de cistos pré-existentes. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas, podendo o paciente evoluir para óbito (DUBEY; JONES et al., 2008; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Além disso recentemente têm-se associado muitos distúrbios neuropsiquiátricos á infecção crônica por *T.gondii* (TORREY et al., 2012; NISHYAMA, et al. 2020; GAMEA, et al. 2022).

A retinocoroidite é considerada o sinal clínico mais frequente na toxoplasmose crônica em pacientes assintomáticos, além disso a infecção ocular causada por este protozoário é a maior causa de retinocoroidite, catarata, estrabismo ou nistagmo e até mesmo cegueira total, que podem ocorrer devido a inflamação necrosante em decorrência da intensa multiplicação do parasito no local ou da inflamação exacerbada resultante da resposta imune do hospedeiro (SILVEIRA et al.,

2015; BARROS, et al. 2022).

Além da infecção toxoplásmica primária, pode ocorrer transmissão transplacentária do parasito por reativação da doença materna crônica causada por alguma disfunção imunológica (REMINGTON et al., 2001; KODJIKIAN, 2010). Infecções anteriores à gestação oferecem menor risco ao feto, caso ocorram no mínimo três meses antes da concepção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROSTAMI et al., 2020). Gestantes imunocompetentes e com infecção crônica não apresenta risco significativo de transmitir a infecção para o feto (SENSINI, 2006), porém essa transmissão pode ocorrer em consequência à reativação de infecção ou reinfeção por cepas de diferentes genótipos (VALDÈS et al., 2011). A transmissão vertical da toxoplasmose ocorre em 20 a 50% dos casos de primo infecção (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

A severidade da transmissão congênita pode variar conforme o período gestacional, por exemplo, no primeiro trimestre a transmissão é mais difícil de ocorrer do que no último trimestre, isso ocorre devido a fatores como o desbalanço imunológico (BLASZKOWSKA E GÓRALSKA, 2014) e a espessura da placenta que no início tem de 50-100 μm de espessura e diminui progressivamente até o fim da gestação para 2,5-5 μm de espessura, além disso, a camada interna do citotrofoblasto é descontínua, fazendo com que o número de células diminua durante a gestação facilitando a invasão de formas taquizoítas (BLASZKOWSKA E GÓRALSKA, 2014; DUBEY, 2021). Apesar da maior dificuldade de invasão no primeiro trimestre, se houver a transmissão congênita as consequências para o feto podem ser graves com alta morbidade e mortalidade (DUBEY, et al. 2021; BARROS, et al. 2022).

O Dr. Albert Sabin propôs em 1950 uma tríade de sinais que caracteriza a toxoplasmose congênita, a Tríade de Sabin, a qual compreende sinais como hidrocefalia ou microcefalia, calcificação intracraniana e retinocoroidite. Além disso a infecção congênita pode acarretar em manifestações clínicas como encefalomielite, retardamento mental e psicomotor, catarata, estrabismo, cegueira, comprometimento auditivo, parto prematuro, natimorto e aborto (ELSHEIKA, 2008; CARLIER et al., 2012; MORAIS et al., 2020; DUBEY, et al. 2021).

Porém em muitos casos os recém-nascidos não apresentam sinais clínicos, no entanto esses sinais podem aparecer no decorrer da infância (DUBEY, et al. 2021).

Casos de comprometimento ocular por exemplo podem ocorrer durante a fase aguda ou muitos anos após a doença sistêmica, sendo o intervalo de latência muito variável. Isso torna difícil o diagnóstico da toxoplasmose ocular pós-natal. (CORDEIRO et al., 2010).

Embora a soroprevalência da infecção varia muito conforme a região geográfica, mundialmente um terço da população é afetada (STELZER et al., 2019). Enquanto na Europa houve uma diminuição nas últimas duas décadas, ainda há uma prevalência muito alta em vários outros países (McLEOD et al., 2020; PAULA et al., 2022). América Central e América do Sul são regiões onde a prevalência varia entre 30 a 90%, Alemanha cerca de 55%, China de 3,4% a 17,5% e Estados Unidos 11,4%. (JONES e DUBEY, 2014; WILKING et al., 2016; LASSEN et al., 2016; PAN et al., 2017; BARROS et al., 2022). No Brasil a variação da infecção da população geral está entre 42-90% (DIESEL, 2019).

Na infecção congênita a prevalência mundial é de de 45% na África Central, 63% no Chile, 51% na Argentina, 54,8% na Austrália, cerca de 50% na América do Sul e Oriente Médio e 10-30% na Europa e América do Norte (REMINGTON *et al.*, 2001; TORGERSON e MASTROIACOVO 2013; ROSTAMI *et al.*, 2019; ROSTAMI *et al.*, 2020; ADUGNA *et al.*, 2021, MIHU *et al.*, 2022). A prevalência em gestantes no Brasil segue a mesma da população geral, entre 42-90% (DIESEL, 2019). Enquanto que em Londrina a soroprevalência em gestantes é cerca de 50% (PAULA et al. 2022).

Em 2018 foi registrado um surto de toxoplasmose em Santa Maria no Rio Grande do Sul, a qual identificaram que a forma de transmissão ocorreu por meio da água, por esse motivo a população em geral foi afetada, incluindo as gestantes, mostrando que de 900 casos confirmados na cidade 146 eram mulheres grávidas (PAULA, 2022).

Apesar da falha de diagnóstico em muitos casos, dados mostram que no Brasil há cerca de 10 casos de toxoplasmose congênita a cada 10.000 nascidos vivos (BISCHOFF, 2015).

O maior estudo de toxoplasmose congênita feito no Brasil foi realizado no estado de Minas Gerais onde foram coletados e feito teste sorológico IgM em amostras de sangue de 146.307 recém-nascidos de 853 municípios do estado. Desses, 190

foram confirmados, não incluindo mortalidade uterina e recém-nascidos IgM negativos para *T.gondii*. Das crianças que testaram positivo 142 apresentavam lesões oculares aos 2 meses de idade e 46 apresentaram perda auditiva (VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009; RESENDE et al., 2010; CARNEIRO et al., 2013; DUBEY et al., 2021). Já outro estudo mais recente realizado em Porto Alegre que acompanhou 77 crianças infectadas congenitamente dos 2 aos 25 anos revelou que 55 apresentaram doenças oculares durante a vida e 44 calcificação intracerebral, além de hidrocefalia em 4, microcefalia em 9 e perda auditiva em 3 (LAGO et al., 2021; DUBEY et al., 2021). Esses estudos quando comparados por exemplo com trabalhos realizados na Europa mostram que a taxa de infecção e a severidade da doença é maior no Brasil. Acredita-se que essa diferença ocorra devido a diferentes genótipos das cepas encontradas no Brasil (DUBEY et al., 2012; DUBEY et al., 2021).

1.1.4 CEPAS DE *TOXOPLASMA GONDII*

Diferentes cepas de *T. gondii* existem globalmente e estão amplamente distribuídas na natureza (DUBEY; SU, 2009). As diferenças genéticas nessas cepas resultam em um nível altamente variado de virulência que resultam em diversos efeitos patológicos no hospedeiro (SANA, 2022).

Os primeiros estudos com cepas foram realizados por regiões geográficas e numericamente restritos. Análises moleculares de isolados dispersos principalmente na Europa e Estados Unidos, mostram que a maioria das cepas apresenta um padrão genético clonal e são pertencentes a um dos três genótipos designados como tipo I mais virulentas (RH, BK e VEL), II e III (SIBLEY; AJIOKA, 2008; STUTZ et al., 2012) as quais são principalmente encontradas na Europa, América do Norte e Ásia (SHWAB et al., 2016) e cepas do tipo II como ME49, WIL, HART e tipo III como VEG e SOU, as quais apresentam virulência de moderada a baixa (JOKELAINEN et al., 2018).

Existem casos de cepas isoladas que não se enquadram em nenhuma das três linhagens, isso porque apresentam padrão genético diferente e são classificadas como cepas atípicas (MELO et al., 2013; SHWAB et al., 2014).

Cepas do tipo I, principalmente RH, são as mais utilizadas experimentalmente devido a sua maior capacidade de replicação, além disso estão

associadas à infecção aguda, casos graves e sintomáticos (MONTAZERI et al., 2017; ARMAND et al., 2017). As cepas do tipo II e III são associadas a infecção na fase crônica, isso porque possuem baixa virulência e multiplicação mais lenta, favorecendo a formação mais rápida de cistos teciduais, estão associadas a casos assintomáticos e mais brandos (JOKELAINEM et al., 2018).

A maior parte dos casos é resultante da infecção por cepas do tipo II, isolados do tipo I e II estão relacionados à toxoplasmose congênita mais grave (ARMAND et al., 2017; ARRANZ-SOLÍS et al. al., 2021).

1.1.5 RESPOSTA IMUNE DA TOXOPLASMOSE

O controle da infecção por *T. gondii* ocorre principalmente pela imunidade celular, permitindo que o sistema imune do hospedeiro controle a replicação do parasito (LINDBERG; FRENKEL, 1977; SCHLÜTER et al., 1991). No início da infecção por *T.gondii*, a resposta imune inata mediada por células dendríticas, macrófagos, células natural killer (NK) e neutrófilos são responsáveis pela primeira linha de defesa. Brevemente, a resposta imune inata, mediada por células, é desencadeada contra a toxoplasmose quando quimiocinas liberadas pelas células infectadas atraem células fagocíticas. A interação de células e antígeno induzem a produção de IL12. A liberação de IL12 por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos é essencial para a liberação de IFN γ de células NK (resposta imune inata)e linfócitos T (resposta imune adaptativa) (SANA, 2022).

A infecção por *T. gondii* em pessoas imunocompetentes geralmente causa apenas sintomas leves, isso porque os taquizoítas são suprimidos rapidamente por uma resposta imune eficaz, estudos têm demonstrado que linfócitos T CD4+ e CD8+ e citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ são os principais componentes envolvidos contra *T. gondii* (SHER et al. , 2017; EL-KOWRANY, 2019; SANA, 2022).

IFN- γ (Interferon Gama) é uma potente citocina ativadora de macrófagos, que quando ativados produzem óxido nítrico (NO) permitindo ação tóxica contra o parasito (MILLER et al., 2009; PIFER; YAROVINSKY, 2011; HU, 2017). Altas concentrações de NO são produzidas em resposta à citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β durante as infecções parasitárias (BRUNET, 2001). Como células apresentadoras de antígenos produzem altos níveis de IL-12 em resposta a alguns antígenos liberados

por taquizoítas, essa interleucina estimula células NK a produzir e secretar altos níveis de IFN- γ , o qual induz a diferenciação de linfócitos T CD4+ na subpopulação Th1, predominante no curso da infecção por *Toxoplasma* (ABBAS; LICHTMAN, 2003; HU, 2017), no qual citocinas como IFN- γ atuam favorecendo a conversão de taquizoítas em bradizoítas, além de impedir a ruptura de cistos teciduais, e consequentemente inibe a reativação do parasito no hospedeiro (DENKERS et al., 1997; WANG; KIKUCHI; SUZUKI, 2004; FOX et al., 2016).

A resposta imune mediada por células T desempenham um papel importante na supressão da replicação de taquizoítas e resistência ao *T. gondii*, resultando em infecção crônica (MONTROYA E LIESENFELD, 2004 ; MELO et al., 2020; BARROS, et al.,2022).

Os cistos persistem por toda a vida do hospedeiro (ROUGIER et al., 2017), sob o controle de processos dependentes de IFN- γ (STURGE E YAROVINSKY, 2014 , YAROVINSKY, 2014). Os cistos teciduais são capazes de se reativar no estágio agudo de taquizoíta e isso é de particular preocupação para indivíduos imunocomprometidos, particularmente pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), cujas populações de células TCD4+ são drasticamente reduzidas, consequentemente levando a diminuição de IFN- γ (SMITH 2021).

Embora o controle da disseminação do parasito seja mediado essencialmente pelo padrão de resposta pró-inflamatória, a existência de atividades protetoras que amenizem os efeitos gerados pelos mecanismos microbicidas citados, mostra-se essencial à garantia da integridade celular e tecidual do hospedeiro (ALIBERTI, 2005). Assim, a articulação entre citocinas com papel regulador, como IL-4, IL-10 e TGF β desempenham ações anti-inflamatórias capazes de controlar a produção e as funções de IL-12 e IFN- γ contra *T. gondii*, prevenindo assim, a geração de uma resposta inflamatória exacerbada e danosa ao hospedeiro (ALIBERTI et al., 2005).

Em humanos, o perfil de citocinas regulatórias pode ter variação conforme a cepa de *T. gondii* . Em infecções pelo tipo I (cepa RH), a translocação de NF- κ B não ocorre resultando na produção de citocinas anti-inflamatórias (IL10, IL27 e TGF β 1) o que consequentemente aumenta a proliferação do *T. gondii*. No entanto, a infecção pelo tipo II (cepa ME49), induz a translocação de NF- κ B que leva a produção de

citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL12, IL18, TNF α , IFN γ e IL12p40), o que resulta em uma resposta mais efetiva contra o parasito (SANA, 2022).

A resposta imune humoral ao *T. gondii* apresenta atuação menos direta no controle da infecção, porém ainda assim possui extrema importância principalmente durante a fase aguda, tanto no combate a taquizoítas pela resposta antígeno-específica quanto para o diagnóstico laboratorial através da dosagem de anticorpos para determinar o estágio da infecção (SABIN; FELDMAN, 1948). A classe de anticorpos IgM é a primeira a aparecer no início da infecção pelo parasito. Esses anticorpos são típicos da fase aguda ou recente, e vão diminuindo conforme a infecção evolui para a fase crônica (TAKAHASHI; ROSSI, 1997). Anticorpos IgG são característicos da fase crônica da toxoplasmose e aparecem cerca de duas semanas após a infecção, sendo detectáveis por toda a vida, sendo que quanto maior o tempo de infecção maior a avidéz dessa imunoglobulina (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Porém a resposta humoral sozinha não é eficiente em prevenir a reativação do parasito, isso fica evidente em pessoas que não apresentam resposta imune efetiva, isso porque ainda apresentam sintomas da infecção e reativação por *T. gondii*, mesmo na presença de altos títulos de IgG específico (SANA, 2022). A detecção e titulação desses anticorpos se torna essencial durante a gestação para detecção de infecção aguda ou reativação da doença, que pode ser fatal para o feto (PAULA, 2022).

Durante a gravidez, a tolerância imunológica materna é essencial para o sucesso da gestação, o equilíbrio entre a inativação de células efectoras alorreativas e a imunossupressão desencadeada por células imunes reguladoras constituem essa tolerância (PIRELA 2021). As Tregs são documentadas como importantes reguladores na manutenção da gravidez pois desempenham um papel crucial na tolerância fetal, invasão trofoblástica e remodelação tecidual e vascular, juntamente com outros leucócitos (macrófagos, células NK e células dendríticas) (GAO, 2021).

Durante a transmissão congênita, o parasito atravessa a placenta diretamente ou com a ajuda de macrófagos e células dendríticas infectadas, usando-as como “cavalos de Tróia” (ARRANZ-SOLÍS et al., 2021).

A infecção por *T. gondii* desequilibra o padrão de resposta Th1/Th2 com

dominância Th1 na placenta, com diminuição de IL-4 e IL-10 e aumento de IFN- γ , além da diminuição da quantidade e função das células Treg (PIAO, 2018). Por fim, a infecção por *T. gondii* durante a gestação pode destruir a tolerância imunológica, o que pode levar à rejeição imunológica materna, podendo afetar o crescimento fetal e causar aborto ou outras complicações na gravidez (GAO, 2021).

1.1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE

O diagnóstico da toxoplasmose é em grande parte laboratorial, isso porque devido a maior parte dos casos serem assintomáticos ou apresentarem sintomas inespecíficos, o diagnóstico clínico se torna sozinho, insuficiente (MINEO e VITOR, 2016).

Comumente são realizados testes sorológicos, principalmente o teste imunoenzimático (ELISA) para confirmação da infecção que indicam se há a presença de anticorpos específicos, IgM durante a fase aguda da infecção e IgG durante a fase crônica (TANIMURA et al., 2015; MINEO e VITOR, 2016).

Vale ressaltar a importância do ELISA-avidez no diagnóstico. O teste de avidez de anticorpos IgG analisa a força de ligação do complexo formado antígeno-anticorpo. Na fase aguda da doença, uma vez que a síntese de anticorpos é recente, a ligação do complexo antígeno-anticorpo é facilmente dissociável, concluindo que a IgG tem reduzida avidez pelo antígeno. Já na fase crônica, formam-se complexos antígeno-anticorpo de difícil dissociação, representando resultado com IgG de elevada avidez (LEÃO; MEIRELES-FILHO; MEDEIROS, 2004; TANIMURA et al., 2015). Técnicas moleculares (reação em cadeia da polimerase, PCR tempo-real) apresentam-se como método mais sensível, e tem se mostrado útil em várias aplicações, incluindo a detecção de DNA do parasito, pois a amplificação dos ácidos nucleicos permite a detecção mínima da quantidade do DNA alvo mesmo na presença de altas concentrações do DNA do hospedeiro ou de outros organismos coinfectantes (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

As opções atuais de tratamento para toxoplasmose são limitadas (DUNAY et al., 2018). O uso combinado de pirimetamina e sulfadiazina é aprovado como tratamento de escolha para a toxoplasmose desde 1950. A pirimetamina pertence ao grupo das amino-pirimidinas e a sulfadiazina está relacionada às sulfonamidas

(MOLINA, 2021). Seu uso combinado é oitenta vezes mais efetivo que a utilização das drogas separadamente, as drogas atuam sinergicamente no metabolismo do ácido fólico (SMITH, 2021).

T.gondii codifica uma enzima chamada diidrofolato redutase -timidilato sintase (DHFR) que é importante para o metabolismo do folato e síntese de nucleotídeos (IVANETICH E SANTI, 1990; TRUJILLO et al., 1996). A pirimetamina, tem como alvo o DHFR agindo como um antagonista do ácido fólico. A pirimetamina atua sinergicamente com as sulfonamidas como a sulfadiazina, que atuam na diidrofolato sintase, outra enzima na via de síntese do folato (SMITH, 2021).

Sulfadiazina e pirimetamina não são bem toleradas pelo organismo, apresentando alta toxicidade e efeitos colaterais adversos como erupção cutânea, febre, teratogenicidade e principalmente supressão de atividades da medula óssea (PETERSEN, 2007; MARTINS-DUARTE et al., 2006; SILVA; FERNANDES, et al., 2019; SMITH, 2021). Devido à essa toxicidade é utilizado ácido fólico para prevenir a depressão medular causada pelas drogas antifolato. A atividade farmacodinâmica deste medicamento se deve ao fato de serem análogos estruturais do ácido p-aminobenzóico (PABA). Através da inibição competitiva, as sulfonamidas impedem a incorporação do ácido p-aminobenzóico durante a biossíntese do ácido diidropteróico, funcionando dessa forma como antimetabólito (SILVA, 1998; GOBEL et al., 2007; MINEO e VITOR, 2016).

Em casos graves ou sintomáticos, a duração do tratamento com a associação de pirimetamina e sulfadiazina é geralmente de 4 a 6 semanas. Pacientes imunocomprometidos em alguns casos ainda requerem terapia de manutenção de longo prazo após o tratamento inicial de 6 semanas, salienta-se que nenhum dos tratamentos atuais utilizados são capazes de eliminar os cistos teciduais (SMITH, 2021).

Outra classe de medicamentos utilizados na toxoplasmose são os macrolídeos que apresentam efeito tóxico ao parasito através da ligação a açúcares e inibem a síntese proteica deste. O macrolídeo mais comum utilizado contra a toxoplasmose é a espiramicina, utilizada quando há infecção durante a gestação (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

A espiramicina possui atividade toxoplásmica intracelular e capacidade de retardar a transmissão do parasito, promovendo redução na seriedade da infecção fetal, por isso é indicada quando apenas a mãe é infectada (REMINGTON et al., 2001; KATZUNG, 2006, KONSTANTINOVIC et al., 2019).

A terapia com espiramicina é utilizada em gestantes desde o primeiro trimestre, isso porque ela possui baixa capacidade em atravessar a placenta, não sendo ativa no feto, porém impede a transmissão materno-fetal, portanto quando a gestante está infectada a terapia deve ser mantida até o final da gestação, se o feto não estiver infectado. No caso de infecção fetal, confirmado por alterações na ultrassom fetal ou PCR positiva em líquido amniótico, o tratamento é complementado com sulfadiazina que atravessa a placenta e que tem capacidade de atuar sobre os taquizoítas no feto, devido a sua característica teratogênica a pirimetamina não deve ser usada no primeiro trimestre de gestação. Quando a infecção é adquirida no terceiro trimestre de gestação a terapia utilizada é a convencional com o esquema de sulfadiazina + pirimetamina + ácido fólico (MINEO e VITOR, 2016; KONSTANTINOVIC et al., 2019).

Devido ao elevado índice de toxicidade apresentada pelos fármacos citados acima e que atualmente são utilizados no tratamento da toxoplasmose destaca-se a necessidade de terapias alternativas anti- *Toxoplasma*.

1.1.7 ÁCIDO CAFEICO

O ácido cafeico (AC), um metabólito secundário da via dos fenilpropanóides das plantas, classificado como ácido 3,4-dihidroxicinâmico, é um composto fenólico, encontrado em abundância em muitas plantas e alimentos, incluindo frutas e vegetais como café, vinho, própolis, mel, batatas, frutas vermelhas, ervas, azeitonas, acelga, cenoura, chá verde. Pertencem a um grupo de compostos fenólicos não flavonóides os quais contêm um único grupo fenil substituído por um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila (OH) (KEPA, 2018; KADAR, 2021).

O AC participa no mecanismo de proteção das plantas contra predadores e pragas, inibindo o crescimento e a sobrevivência de insetos, fungos e bactérias (TOŠOVIĆ, 2017; ALAM, 2022). Os polifenóis como o ácido cafeico são compostos orgânicos que se distinguem por enormes variedades de partes estruturais de fenóis

que atuam como as bases de funções químicas, biológicas e física, e essa variedade estrutural influencia na sua biodisponibilidade (BIRKOVÁ et al., 2020; ALAM, 2022). O efeito do AC no sistema humano é principalmente devido as suas funções antioxidantes as quais permitem a remoção de radicais livres e inibem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BIRKOVÁ et al., 2020).

AC é obtido de plantas a partir da extração com solvente na temperatura mais alta (LIN E YAN, 2012 ; RODRIGUES et al., 2015). O composto também pode ser obtido em grandes quantidades por meio de síntese orgânica (TOUAIBIA E GUAY, 2011; ALAM, 2022).

Diversos trabalhos já comprovaram o efeito antimicrobiano do composto (KIM, 2014), apresentando diferentes mecanismos de ação sobre os microorganismos como aumento da permeabilidade da membrana celular, despolarização de membrana celular, redução da atividade respiratória de bactérias, dano a integridade da membrana celular, atividade antibiofilme, inibição do fator de virulência α -hemolisina, interrupção da síntese de ATP e resistência térmica de esporos reduzida, além de inibir atividade enzimática e desencadear danos em proteínas (BOWLES, 1994; KWON et al., 2007; PINHO et al., 2014; RUNGSIMAKAN et al., 2014; SILVA et al., 2014; KYSELKA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018; KHAN et al., 2021; ARCISZEWSKA, 2022).

AC possui também atividade antioxidante (KADAR, 2021), imunomoduladora (KEPA, 2018) antineoplásica (ESPINDOLA, 2019), neuroprotetora, ansiolítica (KOGA, 2019), antiproliferativa e antiinflamatória (PEREIRA, 2006), anti-*Leishmania* e anti-tripanosossal (OTERO, 2017; BORTOLETI, et al., 2019).

Estudo recente onde foi avaliado a toxicidade do composto em células trofoblásticas extravilosas demonstrou que o ácido cafeico tem potencial citoprotetor em células trofoblásticas HTR-8/SVneo (KHAN, 2021; KOSTIC, 2022) e não apresenta toxicidade materna, teratogênese fetal ou efeitos pós-natais em camundongos (LIU, 2019).

Embora haja diferentes trabalhos sobre a atividade microbicida do ácido cafeico, ainda não há estudos realizados sobre sua ação direta em *Toxoplasma gondii*, nem sua atividade em modelo de infecção congênita utilizando a linhagem celular

trofoblástica HTR-8/SVneo.

1.1.8 CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS EXTRAVILOSAS HTR- 8/SVNEO

A placenta humana é do tipo hemocorial, no qual as células trofoblásticas penetram nos vasos sanguíneos maternos e entram em contato direto com o mesmo (MOFFETT & LOKE 2006). O desenvolvimento placentário, seus subtipos de trofoblastos epiteliais e sua interação com células maternas e fatores de crescimento uterino são cruciais para implantação e desenvolvimento bem sucedido da gravidez (POLLHEIMER, 2018).

As células trofoblásticas se desenvolvem a partir do trofectoderma, o qual forma a parede do blastocisto e se diferencia em duas linhagens, vilosas e extravilosas. O trofoblasto viloso se diferencia em sinciciotrofoblasto e cobre as vilosidades placentárias enquanto o trofoblasto extraviloso invade vilosidades de ancoragem na decídua e tem função de fixar a placenta à parede uterina e remodelar as artérias espiraladas, são portanto, um tipo celular importante envolvido no processo de placentação (ABBAS, 2020; LI, 2021).

Células trofoblásticas extravilosas humanas transformadas a partir da transfecção do antígeno T do vírus símio, SV40, originaram a linhagem celular HTR-8/SVneo. A transfecção confere à célula uma capacidade de divisão ilimitada, ao mesmo tempo em que mantém as características de células trofoblásticas extravilosas humanas (GRAHAM et al., 1993), demonstrando ser excelente modelo experimental de trofoblasto humano para estudo da infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal isso porque na placenta o parasito infecta diferentes tipos de células, incluindo trofoblastos extravilosos (ABBASI et al., 2003 ; ROBBINS et al., 2012; CASTRO et al., 2013; BARBOSA et al., 2015; CASTRO, 2017; COSTA et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito anti-proliferativo, imunológico, bem como os mecanismos envolvidos no processo de morte pelo ácido cafeico sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) e na infecção de células trofoblásticas extravilosas HTR8/SVneo.

2.2 Objetivos Específicos:

- Verificar a citotoxicidade do ácido cafeico sobre células HTR8/SVneo;
- Determinar o efeito anti-proliferativo do ácido cafeico sobre as formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (cepa RH);
- Avaliar estresse metabólico como integridade de membrana mitocondrial e gotículas lipídicas decorrentes do tratamento direto com ácido cafeico em taquizoítos de *T. gondii*.
- Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nas células infectadas ou não pela cepa RH de *T. gondii* e tratadas ou não com ácido cafeico;
- Avaliar a quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) nas células infectadas pela cepa (RH) de *T. gondii* e tratadas ou não com ácido cafeico e quantificar a produção de NO e espécies reativas de oxigênio (ERO) em taquizoítas de *T.gondii* tratados com AC.
- Investigar eventos envolvidos com o processo de morte celular, autofagia, necrose e/ou apoptose, após o tratamento direto com ácido cafeico em taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH).
- Realizar análise morfológica de células infectadas com taquizoítas de *T. gondii* após tratamento com ácido cafeico utilizando microscopia ótica.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: W.B. Saunders, p.553, 7a edição 2003.
- ABBAS, Y.; TURCO, M.Y.; BURTON, G.J.; MOFFETT, A. Investigation of human trophoblast invasion *in vitro*. Hum Reprod Update. 2020.
- ABBASI, M. et al. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. J. Infect. Dis. p.608–616, 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.
- ALAM, M.; AHMED, S.; ELASBALI, A.M.; ADNAN, M.; ALAM, S.; HASSAN, M.I.; PASUPULETI, V.R.
- Therapeutic Implications of Caffeic Acid in Cancer and Neurological Diseases. Front Oncol. 2022.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. Nat.Rev. Immunol, v.5, p.162-170, 2005.
- AMENDOEIRA, M.R.R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. An Acad Nac Med. 1995.
- ARCISZEWSKA, Ż.; et al. Caffeic Acid/Eu (III) complexes: Solution equilibrium studies, structure characterization and biological activity. International journal of molecular sciences, v. 23, n. 2, p. 888, 2022.
- 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.
- ARRANZ-SOLÍS, D.; MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J. J. P. *Toxoplasma* effectors that affect pregnancy outcome. Trends in parasitology, v. 37, n. 4, p. 283-295, 2021.
- ATILLA, A.; AYDIN, S.; DEMIRDÖVEN, A. N.; KILIÇ, S. S. Severe toxoplasmic hepatitis in an immunocompetent patient. Japanese Journal of Infectious Diseases, v. 68, n. 5, p. 407-409, 2015.
- BARBOSA, M. A.; ANGELIN, L. G.; SAIKAWA, G. I. A.; OLIVEIRA, C. J. C.; DA SILVA, S. S.; VENDRUSCOLO, J. W.; MARINELLO, P. C.; FUJITA, T. C.; ROCHA, S. P. D.; WATANABE, M. A. E.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; COSTA, I. N. Potenciais alternativas terapêuticas em estudo para a toxoplasmose congênita: Uma revisão bibliográfica. Revista Patologia Tropical, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2015.
- BARROS, R.A.M.; TORRECILHAS, A.C.; MARCIANO, M.A.M.; MAZUZ, M.L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; FUX, B. Toxoplasmosis in Human and Animals Around the World. Diagnosis and Perspectives in the One Health Approach, Acta Tropica, v. 231, 2022.
- BIRKOVÁ, A.; HUBKOVÁ, B.; BOLERÁZSKA, B.; MAREKOVÁ, M.; ČIŽMÁROVÁ, B. Caffeic Acid: a Brief Overview of its Presence, Metabolism, and Bioactivity. Bioactive Compounds Health Dis. p.74–81, 2020.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS About author manuscript*, v. 117, n. 5-6, p.458-476, 2009.

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

BISCHOFF, A. R.; et al. Incidência de toxoplasmose no período de 10 anos em um hospital universitário e frequência de sintomas nesta população. *Boletim Científico de Pediatria*, v. 4, n. 2, p. 38-44, 2015.

BORTOLETI, B.T.S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; GONÇALVES, M.D.; MIRANDA-SAPLA, M.M.; ASSOLINI, J.P.; CARLOTO, A.C.; LIMA, D.M.; SILVEIRA, G.F.; ALMEIDA, R.S.; COSTA, I.N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W.R. Caffeic acid has antipromastigote activity by apoptosis-like process; and anti-amastigote by TNF- α /ROS/NO production and decreased of iron availability, *Phytomedicine*, v.57, p.262-270, 2019.

BOUCHUT, A.; GEIGER, J. A.; DE ROCHER, A. E.; MARILYN PARSONS, M. Vesicles Bearing *Toxoplasma* Apicoplast Membrane Proteins Persist Following Loss of the Relict Plastid or Golgi Body Disruption. *PloS One*, v. 9, n. 11, 2014.

BOWLES, B. L.; MILLER, A. J. Caffeic acid activity against *Clostridium botulinum* spores. *Journal of food science*, v. 59, n. 4, p. 905-908, 1994.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. *International immunopharmacology*, v. 1, n. 8, p.1457–1467, 2001.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. *Acta Tropica*, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.

CARNEIRO, A.C.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.M. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil, *J. Clin. Microbiol.* p. 901-907, 2013.

CASTRO, A.S. Influência de células trofoblásticas BeWo e infecção por *Toxoplasma gondii* na modulação dos mecanismos de morte celular em células THP-1. 2017. 104 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

CASTRO. A. S., ALVES. C. M., ANGELONI. M. B., GOMES. A. O., BARBOSA. B. F., FRANCO. P. S., SILVA. D. A., MARTINS-FILHO. O. A., MINEO. J. R., MINEO. T. W., FERRO. E. A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta*, v. 34, n. 3, p. 240-247, Mar, 2013.

CENCI-GOGA, B. T.; ROSSITTO, P. V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C. M. E.; CULLOR, J. S. *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.8, n. 7, p. 751-762, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Toxoplasmosis (Toxoplasma infection)*. Available in: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>, Access in: March 20, 2022.

COPPENS, I., & JOINER, K. Parasite–host cell interactions in toxoplasmosis: New avenues for intervention? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, p.1-20, 2001.

CORDEIRO, C. A.; MOREIRA, P. R.; DUTRA, W. O.; YOUNG, L.; CAMPOS, W. R.; ORÉFICE, F.; TEIXEIRA JÚNIOR, A. L. Immunology of the Toxoplasmic etinochoroiditis. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 73, n. 6, p. 548-551, 2010.

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.

DENKERS, E. Y.; YAP, G.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; BUTCHER, B. A.; CASPAR, P.; HEINY S, SHER A. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*, v. 159, n. 4, p.1903-1908, 1997.

DIESEL, A. A.; et al. Follow-up of Toxoplasmosis during pregnancy: Ten-year experience in a University Hospital in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 41 n. 9, p. 539-547, 2019.

DJAKOVIC O.D.;CAMET J.D.; GIESSEN J. V.; DUBEY J.P.; Toxoplasmosis: Overview from a one healthperspective, v.15, 2019.

DOS SANTOS, J. F. S.; et al. *In vitro* e *in silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* effluxpumps by caffeic and gallic acid. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 57, p. 22-28, 2018.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachizoites, bradizoites, and sporozoites and biology and development of tissue cyst. *Clinical Microbiology*. v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and Where did they come from. *Memórias do Instituto Oswalo Cruz*, v. 104, n. 2, p. 190-195, 2009.

DUBEY, J. P.; et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P.; The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii*, Elsevier, p. 1-19, 2020.

DUBEY, J. P.; et al. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology*, v. 148, n. 12, p. 1406-1416, 2021.

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

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.;GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy:case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *The Journal ofInfectious Diseases*, v.199, n. 2, p. 280 –285, 2009.

EL-KOWRANY, S.I.; EL-GHAFFAR, A.E.A.; SHOHEIB, Z.S.; MADY, R.F.; GAMEA, G.A.M. Evaluation of nitazoxanide as a novel drug for the treatment of acute and chronic toxoplasmosis. *Acta Trop*. 2019.

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

ESPINDOLA, K. M. M.; et al. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Frontiers in oncology*, v. 9, p. 541, 2019.

FERGUSON, D. J. P.; *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homenagem a Nicolle, Manceaux e Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online], v. 104, n.2, p. 133-148, 2009.

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, p.302, 2001.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiori di Sanita*, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FOX, B.A; ROMMEREIM, L.M.; GUEVARA, R.B., et al. The *Toxoplasma gondii* Rhopty Kinome Is Essential for Chronic Infection. *mBio*. 2016.

FREPPEL, W.; FERGUSON, D.J.P.; SHAPIRO, K.; DUBEY, J.P.; PUECH, P.H.; DUMÈTRE, A. Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. *Cell Surf*. 2019.

GAMEA, G. A.; et al. Direct and indirect antiparasitic effects of chloroquine against the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii*: An experimental study. *Acta Tropica*, v. 232, p. 106508, 2022.

GAO, X.; et al. The Role and Function of Regulatory T Cells in *Toxoplasma gondii*-Induced Adverse Pregnancy Outcomes. *Journal of Immunology Research*, v. 2021, 2021.

GOBEL, A.; MCARDELL, C. S.; JOSS, A.; SIEGRIST, H.; GIGER, W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of The Total Environment*, v. 372, n. 2-3, p. 361–371, 2007.

GOMES, D. F. C.; et al. *Toxoplasma gondii* in cattle in Brazil: A review. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [online], v. 29, n. 1, e015719, 2020.

GRAHAM, C.H.; HAWLEY, T.S.; HAWLEY, R.G.; et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*. v.206, p.204-211, 1993.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clinical and Experimental Medicine*, v. 3, n. 2, p. 84-105, 2003.

HU, S.; WEI, W.; KORNER, H.; The role of monocytes in models of infection by protozoan parasites. *Mol. Immunol*. v.88, p. 174-184, 2017.

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.

IVANETICH, K. M.; SANTI, D. V. Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *FASEB J.*, v. 4, p. 1591-1597, 1990.

JOKELAINEN, 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.

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

KADAR, N.N.M.A.; AHMAD, F.; TEOH, S.L.; YAHAYA, M.F. Caffeic Acid on Metabolic Syndrome: A Review. *Molecules*. 2021

KASPER, L. H.; BOOTHROYD, J. C. Toxoplasma gondii: immunology and molecular biology. In: WARREN, K. S. Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection, 3^o Ed. Cambridge, 1993.

KATZUNG, B. C. Farmacologia Básica & Clínica. 9^o edição, p. 546 - 554, Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, 2006.

KEPA, M.; et al. Antimicrobial potential of caffeic acid against Staphylococcus aureus clinical strains. *BioMed research international*, v. 2018, 2018.

KHAN, F.; et al. Caffeic acid and its derivatives: antimicrobial drugs toward microbial pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 10, p. 2979-3004, 2021.

KIM, Y. H.; et al. Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats. *Journal of exercise rehabilitation*, v. 10, n. 4, p. 209, 2014.

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

KOGA, M.; et al. Caffeic acid reduces oxidative stress and microglial activation in the mouse hippocampus. *Tissue and Cell*, v. 60, p. 14-20, 2019.

KONSTATINOVIC, N.; GUEGAN, H.; STAJNER T.; BELAZ S.; GANGNEUX F.R. Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives. *Food and Waterborn Parasitology*, v.15, 2019.

KOSTIĆ, S.; VILOTIĆ, A.; PIRKOVIĆ, A.; DEKANSKI, D.; BOROZAN, S.; NACKA-ALEKSIĆ, M.; VRZIĆ-PETRONIJEVIĆ, S.; JOVANOVIĆ- KRIVOKUĆA, M. Caffeic acid protects human trophoblast HTR- 8/SVneo cells from H₂O₂-induced oxidative stress and genotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2022.

KWON, Y.-I.; et al. Inhibition of Staphylococcus aureus by phenolic phytochemicals of selected clonal herbs species of Lamiaceae family and likely mode of action through proline oxidation. *Food Biotechnology*, v. 21, n. 1, p. 71-89, 2007.

KYSELKA, J.; et al. Antioxidant and antimicrobial activity of linseed lignans and phenolic acids. *European Food Research and Technology*, v. 243, n. 9, p. 1633-1644, 2017.

LAGO, E.G.; ENDRES, M.M.; SCHEEREN, M.F.D.C., et al. Ocular Outcome of Brazilian Patients With Congenital Toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2021.

LASSEN, B.; JANSON, M.; VILTROP, A.; NEARE, K.; HÜTT, P.; GOLOVLJOVA, I.; et al. Serological Evidence of Exposure to Globally Relevant Zoonotic Parasites in the Estonian Population. *PLoS ONE*, 2016.

LEÃO, P. R.; MEIRELES FILHO, J.; MEDEIROS, S. F. Toxoplasmosis: seroprevalence in postpartum women attended by SUS (Brazilian Public Health System). *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, v. 26, n. 8, p. 627-632, 2004.

LI, Y.; YAN, J.; CHANG, H.M.; CHEN, Z.J.; LEUNG, P.C.K. Roles of TGF- β Superfamily

- Proteins in Extravillous Trophoblast Invasion. Trends Endocrinol Metab. 2021.
- LIN, Y.; YAN, Y. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. Microb. Cell. Fact. 2012.
- LINDBERG, R. E.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in nude mice. Journal of Parasitology, v. 63, n. 2, p. 219-221, 1977.
- LIU, L.; LIU, H.; ZHANG, W.; YAO, M.; LI, B.; LIU, D.; YUAN, Y. Engineering the Biosynthesis of Caffeic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* with Heterologous Enzyme Combinations. Engineering, v.5, p. 287-295, 2019.
- LUÍS, Â.; et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. Biofouling, v. 30, n. 1, p. 69-79, 2014.
- MARTINS-DUARTE, E. S.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 58, n. 1, p. 59–65, 2006.
- MCLEOD, R.; COHEN, W.; DOVGIN, S.; FINKELSTEIN, A.; BOYER, K.M. Human *Toxoplasma* infection Chapter 4 -Human *Toxoplasma* Infection,” in eds. Weiss L. M., Kim K. *Toxoplasma gondii* (Third Edition). (Cambridge, Massachusetts, USA: Academic Press, Elsevier LTD;). p. 117-227, 2020.
- L.M. Weiss, K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii*-The Model Apicomplexan-Perspectives and Methods, Academic Press, London, UK, pp. 143-159, 2020.
- MELO, M.B.; NGUYEN, Q.P.; CORDEIRO, C.; HASSAN, M.A.; YANG, N.; MCKELL, R., et al. Transcriptional Analysis of Murine Macrophages Infected with Different *Toxoplasma* Strains Identifies Novel Regulation of Host Signaling Pathways. PLoS Pathog. 2013.
- MELO, R.P.B.; WANDERLEY, F.S.; PORTO, W.J.N.; PEDROSA, C.M.; HAMILTON, C.M.; DE OLIVEIRAM, H.G.S.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; RÉGO, R.C.D.S.; KATZER, F.; MOTA, R.A. Description of an atypical *Toxoplasma gondii* isolate from a case of congenital toxoplasmosis in northeastern Brazil. Parasitol Res. 2020.
- 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.
- MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology, England, v.39, n. 1, p. 23-39, 2009.
- MINEO, J. R.; VITOR, R. W. A. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. Parasitologia Humana. 13. ed. São Paulo: Atheneu, p. 186-192, 2016.
- MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. Nat Rev Immunol. 2006.
- MOLINA, D.A.; RAMOS, G.A.; ZAMORA-VÉLEZ, A.; GALLEGOS-LÓPEZ, G.M.; ROCHA-ROA, C.; GÓMEZ-MARIN, J.E.; CORTES, E. *In vitro* evaluation of new 4-thiazolidinones on invasion and growth of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2021.
- 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. 9425, p.1965-1976, 2004.

MORAIS, R.A.P.B.; CARMO, E.L.; BICHARA, C.N.C.; SANTOS, B.R.; SILVEIRA, K.W.S.; PÓVORA, M.M. Seroprevalence and risk factors associated with *T. gondii* infection in pregnant individuals from a Brazilian Amazon municipality. *Parasite Epidemiol Control*. 2020.

MORRISSETTE, N., GUBBELS, M.J. "Chapter 16 - The Toxoplasma cytoskeleton: structures, proteins, and processes," in *Toxoplasma gondii* (Third Edition). Eds. Weiss L. M., Kim K. (Academic Press), p.743–788, 2020.

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R.; BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, p. 862-864, 2009.

MUHAMMAD ABDUL KADAR, N. N.; et al. Caffeic acid on metabolic syndrome: a review. *Molecules*, v. 26, n. 18, p. 5490, 2021.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunological Reviews*, v. 240, n. 1, p. 269-85, 2011.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a` corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, v. 147, 763-766, 1908.

NISHIKAWA, Y.; IBRAHIM, H. M.; KAMEYAMA, K.; SHIGA, I.; HIASA, J.; XUAN, X. Host cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular *Toxoplasma gondii* in macrophages. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 73, n. 5, p. 633-639. 2011.

NISHIYAMA, S.; et al. T cell-derived interferon- γ is required for host defense to *Toxoplasma gondii*. *Parasitology International*, v. 75, p. 102049, 2020.

OTERO, E.; GARCÍA, E.; PALACIOS, G.; YEPES, L.M.; CARDA, M.; AGUT, R.; VÉLEZ, I.D.; CARDONA, W.I.; ROBLEDO, S.M. Triclosan-caffeic acid hybrids: Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem*. 2017.

PAN, M.; LYU, C.; ZHAO, J.; Shen Bang Sixty Years (1957–2017) of Research on Toxoplasmosis in China—An Overview, *Frontiers in Microbiology*, v.8, 2017.

PAULA, H.L.; VENDRAME, S.A.; WESS, L.C.; KONOPKA, C.K.; GONÇALVES, T.L.; BECK, S.T. *Toxoplasma gondii* outbreak in southern Brazil: heterogeneity of the serological humoral response in pregnant women and outcomes in newborns, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.103, Issue4, 2022.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; VIDAL, J. E.; SU, C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future microbiology*, v. 4, n. 10, p. 1363-1379, 2009.

PEREIRA, P.; et al. Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 99, n. 5, p. 374-378, 2006.

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

PIAO, L.X.; CHENG, J.H.; AOSAI, F.; ZHAO, X.D.; NOROSE, K.; JIN, X.J. Cellular immunopathogenesis

in primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Parasite Immunol.* 2018.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 9, p. 388-393, 2011.

PINHO, E.; et al. Antibacterial potential of northeastern Portugal wild plant extracts and respective phenolic compounds. *BioMed research international*, 2014.

POLLHEIMER, J.; VONDRA, S.; BALTAYEVA, J.; BERISTAIN, A.G.; KNÖFLER, M. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. *Front Immunol.* 2018

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

RESENDE, L.M.; ANDRADE, G. M. Q.; AZEVEDO, M.F.; PERISSINOTO, J.; VIEIRA, A.B. C. Congenital toxoplasmosis: auditory and language outcomes in early diagnosed and treated children. *Sci. Med.*, 2010.

ROBBINS, J.R.; ZELDOVICH, V.B.; POUKCHANSKI, A.; BOOTHROYD, J.C.; BAKARDJIEV, A.I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

RODRIGUES, J.L.; ARAÚJO, R.G.; PRATHER, K.L.J.; KLUSKENS, L.D.; RODRIGUES, L.R. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.71, p. 36-44, 2015.

ROJAS-PIRELA, M.; et al. Congenital transmission of apicomplexan parasites: a review. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021.

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., RIAHI S.M., GAMBLE H.R., et al. Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol Infect.*, 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.

RUNGSIMAKAN, S.; ROWAN, M. G. Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry*, v. 108, p. 177-188, 2014.

SABIN, A.B.; OLITSKY, P.K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science*. v.85, ed. 2205, p.336-338, 1937.

SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity,

phenomenon affecting a protozoan parasit (*Toxoplasma*). *Science*, 108:660, 1948.

SANA, M.; RASHID, M.; RASHID, I.; AKBAR, H.; GOMEZ-MARIN, J.E.; DIMIER-POISSON, I. Immune

response against toxoplasmosis-some recent updates RH: *Toxoplasma gondii* immune response. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2022.

SCHLÜTER, D.; LOHLER, J.; DECKERT, M.; HOF, H.; SCHWENDEMANN, G. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. *Journal of Neuroimmunology*, v. 31, n. 3, p. 185-198, 1991.

SEEBER, F.; FEAGIN, J.E.; PARSONS, M.; DOOREN, G.G. Chapter 11 - The apicoplast and mitochondrion of *Toxoplasma gondii*, Editor(s): Louis M. Weiss, Kami Kim, *Toxoplasma gondii* (Third Edition), Academic Press, p. 499-545, 2020.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clinical microbiology and infection*, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual review of Microbiology*, v. 62, p. 329-351, 2008.

SILVA, L.A.; FERNANDES, D.M.; MACHADO A.S.; CUNHA, J.L.R.; BARTHOLOMEU, D.C.; VITOR, R.W.A.; Eficácia da sulfadiazina e pirimetamina no tratamento da toxoplasmose experimental com cepas obtidas de casos humanos de doença congênita no Brasil. *Parasitologia Experimental*, v.202, p.7-14, 2019.

SILVA, P. Sulfonamidas e outros quimioterápicos. In: *Farmacologia*. 5° ed. Guanabara Koogan, Cap. 114, p.1021-1035, 1998.

SILVA, T.; OLIVEIRA, C.; BORGES, F. Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review (2009 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v.24, 2014.

SILVEIRA, C.; MUCCIOLI, C.; HOLLAND, G. N.; JONES, J. L.; YU, F.; DE PAULO, A.; BELFORT, R. JR. Ocular Involvement Following an Epidemic of *Toxoplasma gondii* Infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *American journal of Ophthalmology*, v.159, n. 6, p. 1013-1021, 2015.

SHER, A.; TOSH, K. & JANKOVIC, D. O reconhecimento inato de *Toxoplasma gondii* em humanos envolve um mecanismo distinto daquele utilizado por roedores. *Cell Mol Immunol* v.14, p.36-42, 2017.

SHWAB, E.K.; ZHU, X.Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014

SHWAB, E.K.; JIANG, T.; PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* v.46, p.141-146, 2016.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology Research*, v. 107, n. 2, p. 253-260, 2010.

SMITH, N. C.; et al. Control of human toxoplasmosis, *International Journal for Parasitology*, v.51, n.2–3, p. 95-121, 2021.

SPLENDORE, A.; Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. Rev. Soc. Sci. São Paulo,3, p. 109-112. 1908.

STELZER, S.; et al. Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. Food and Waterborne Parasitology, v. 15, p. e00037, 2019.

STURGE,C.R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during Toxoplasma gondii infection. Infect Immun. 2014

STUTZ, A.; KESSLER. H.; KASCHEL, M. E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A. H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by Toxoplasma gondii. Immunobiology, v. 217,n. 1, p. 28-36. 2012.

TAKAHASHI, E. E.; ROSSI, C. L. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo, v. 39, n. 6, p. 327-31, 1997.

TANIMURA, K.; NISHIKAWA, A.; TAIRAKU, S.; SHINOZAKI, N.; DEGUCHI, M.; MORIZANE, M.; EBINA, Y.; MORIOKA, I.; YAMADA, H. 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.

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.

TORREY, E.F.; BARTKO, J.J.; YOLKEN, R.H. Toxoplasma gondii and other risk factors for schizophrenia:an update. Schizophr Bull. p.642-647. 2012.

TOŠOVIĆ, J. Spectroscopic features of caffeic acid: Theoretical study. Kragujevac Journal of Science. p.99-108, 2017.

TRUJILLO, M.; DONALD, R.G.K.; ROOS, D.S.; GREENE, P.J.; SANTI, D.V. Heterologous Expression and Characterization of the Bifunctional Dihydrofolate Reductase–Thymidylate Synthase Enzyme of Toxoplasma gondii. Biochemistry, p.6366–6374, 1996.

VALDÈS, V.; LEGAGNEUR, H.; WATRIN, V.; PARIS, L.; HASCOET, J. M. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. Archives de Pediatrie, v. 18, n. 7, p. 761-3, 2011.

VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; MACHADO AZEVEDO, D.O.; CAMPOS, W.R.; ORÉFICE, F.; QUEIROZ-ANDRADE, G.M.; CARELLOS, E.V.M. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates, Ophthalmology, p. 2199-2205, 2009.

WANG, X. H.; KIKUCHI, T.; SUZUKI, Y. Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. Infection and Immunity, v. 72, n. 8, p. 4432–4438, 2004.

WHITE, M.W.; RADKE, J.R.; RADKE, J.B. Toxoplasma development - turn the switch on or off? Cell Microbiol. p.466-472. 2014.

WILKING, H.; THAMM, M.; STARK, K.; AEBISCHER, T.; SEEGER, F. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of Toxoplasma gondii infection in Germany: a

representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep.* 2016.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, OIE. *Toxoplasmosis (Toxoplasma gondii (Infection with) Aetiology, Epidemiology, Diagnosis, Prevention and Control Potential Impacts of Disease Agent Beyond Clinical Illness References (2021)*. Available in: <<https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>>. Access in May 24, 2022.

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

YBAÑEZ, R.; YBAÑEZ, A. P.; NISHIKAWA, Y. Review on the current trends of toxoplasmosis serodiagnosis in humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 204, 2020.

ZHANG, Y.; LAI, B.S.; JUHAS, M.; ZHANG, Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. *Microbiol Res.* v.227, 2019.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Ácido cafeico reduz proliferação de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas extravilosas (HTR8/SVneo) através da indução de citocinas pró-inflamatórias e processo de morte sugestivo de apoptose

Revista: Phytomedicine.

Fator de impacto: 5.340.

Ácido cafeico reduz proliferação de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas extravilosas (HTR8/SVneo) através da indução de citocinas pró-inflamatórias e processo de morte sugestivo de apoptose

Yasmin Munhoz dos Santos¹, Angélica Paulina Nunes¹, Raquel Arruda da Silva Sanfelice¹, Virgínia Marcia Concato¹, Taylon Felipe Silva⁴, Mariana Barbosa Detoni¹, Danielle Lazarin-Bidoia¹, Sara Mayumi Suzuki¹, Guilherme de Souza³, João Luís Garcia², Ivete Conchon-Costa¹, Wander Rogério Pavanelli¹, Bellisa de Freitas Barbosa³, Eloisa Amália Vieira Ferro³, Idessania Nazareth Costa¹.

E-mail: yasmin.munhozs@uel.br

¹Dep. de Patologia Experimental – Lab. de Imunoparasitologia das Doenças Negligenciadas e Câncer. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, BR.

²Dep. de Medicina Veterinária – Lab. de Protozoologia Animal. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, BR.

³Lab. de Imunofisiologia da Reprodução, Inst. de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, BR

⁴Dep. of Surgery, Cedars-Sinai Medical Center – Los Angeles, Califórnia, EUA.

RESUMO

Introdução: A toxoplasmose, doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, é um grave problema de saúde pública, principalmente devido a capacidade de ocasionar quadros graves na infecção congênita. O tratamento atual limita-se ao uso de espiramicina ou da associação de sulfadiazina e pirimetamina, drogas que apresentam alta toxicidade, o que torna muito importante a busca por compostos naturais alternativos com alta eficiência e baixa toxicidade. **Objetivo:** Este estudo avaliou o efeito *in vitro* do ácido cafeico (AC) em células trofoblásticas extravilosas (HTR8/SVneo) infectadas por *T.gondii*. **Métodos:** A atividade *in vitro* do AC contra taquizoítos livres de *T. gondii* foi avaliada, bem como sua atividade imunológica e anti-*Toxoplasma* em células HTR8/SVneo infectadas. **Resultados:** O composto foi capaz de reduzir a viabilidade dos taquizoítos (IC₅₀ 5 µg/ml) sem apresentar toxicidade nas células (CC₅₀ 1950 µg/ml), além disso, reduziu a proliferação e infecção dos taquizoítos em todas as concentrações testadas (5 - 50µg/ml). ml). A AC também alterou a morfologia dos parasitas com perda da integridade mitocondrial, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, exposição à fosfatidilserina e perda da integridade da membrana plasmática, caracterizando o processo semelhante à apoptose. Além disso, houve aumento nas interleucinas IL-1β, MIF e TGF-β em células HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii*. **Conclusão:** AC é um potencial candidato para novos estudos visando o desenvolvimento de terapias para toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: Toxoplasmose, Infecção Congênita, Ácido cafeico, HTR8/SVneo.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, ocasionada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* é considerada um problema de saúde pública, em pacientes imunocomprometidos, na toxoplasmose ocular e na infecção congênita, a qual pode acarretar em consequências graves para o feto com alta morbidade e mortalidade, quadros que podem ser agravados devido à dificuldade do tratamento disponível (DJAKOVIC et al., 2019; DUBEY, et al. 2021; BARROS, et al. 2022). O uso combinado de pirimetamina e sulfadiazina é aprovado como tratamento de escolha, em gestantes além da combinação é utilizada também a espiramicina (MOLINA, 2021). Porém, os medicamentos atualmente utilizados, apresentam alta toxicidade e efeitos colaterais severos evidenciando a necessidade da busca de novos tratamentos (SMITH, 2021).

O ácido cafeico (AC) é um composto fenólico, encontrado em abundância em muitas plantas e alimentos. Possui atividade antioxidante, imunomoduladora (KADAR, 2021) antineoplásica (ESPINDOLA, 2019), antimicrobiana (KIM, 2014), anti-*Leishmania* e anti-tripanosossomal (OTERO, 2017; BORTOLETI, et al., 2019).

Ainda não há estudos realizados sobre a ação direta e/ou indireta do AC sobre *T.gondii*, nem sua atividade em modelo de infecção congênita. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito anti-proliferativo, imunológico, bem como os mecanismos envolvidos no processo de morte do AC sobre formas taquizoítas de *T.gondii* (cepa RH) e na infecção de células trofoblásticas extravilosas HTR8/SVneo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de Células HTR8/SVneo

Células HTR8/SVneo, foram cedidas pela Profa. Dra. Eloisa Amalia Vieira Ferro da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil. As células foram cultivadas com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Cultilab) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) (Sigma, St Louis, MO, EUA) e mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO².

Manutenção da cepa de *T. gondii*

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, foram cedidos pelo Dr. João Luiz Garcia

do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública da Universidade Estadual de Londrina, obtidos a partir de camundongos Swiss Webster previamente infectados com a cepa RH *T.gondii*. Todos os procedimentos envolvendo os animais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob nº 88/2017/ CEUA.

Viabilidade celular por teste de Resazurina (AlamarBlue™)

A fim de avaliar a citotoxicidade do composto, células HTR8/SVneo foram cultivadas em placas de 96 poços (3×10^4) por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente as células receberam tratamento por 24h com AC (Sigma Aldrich Company) nas concentrações 10-10000 µg/ml. Etanol foi utilizado como veículo para aumentar a solubilidade do composto não ultrapassando 0,5%, posteriormente a diluição foi realizada em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.).

Após o tratamento, os sobrenadantes foram removidos e adicionada resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido - 60µM) durante 2 horas. A intensidade de fluorescência foi quantificada em fluorímetro Glomax® (excitação de 520nm e emissão de 580nm).

Viabilidade de *T. gondii* por Azul de Tripán

Para investigar o efeito direto do composto sobre formas taquizoítas livres de *T.gondii*, como descrito por Sanfelice e colaboradores (2017), taquizoítas (5×10^5) foram tratados com AC (1-200µg/mL), parasitos tratados somente com meio RPMI 1640 foram utilizados como controle negativo, sulfadiazina e pirimetamina (25 e 50µg/mL) como controle positivo, e o etanol (200µg/mL) como controle do veículo. A contagem foi realizada em microscópio óptico (E100, Nikon-LED).

Índice de seletividade

Foram utilizadas a concentração mínima de inibição de 50% dos parasitos (CI 50) e a concentração citotóxica para causar a morte de 50% das células (CC 50). O valor de índice de seletividade foi expresso como $IS = CC 50 \text{ de AC em células HTR8/Svneo} / CI 50 \text{ de AC em taquizoítas}$, conforme descrito por Miranda-Sapla, et al. (2019).

Infecção experimental *in vitro*

A fim de verificar o efeito do composto durante a infecção por *T.gondii*, células HTR8/SVneo (1×10^5) foram mantidas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13mm (Ciencor Scientific) por 24h e posteriormente foram infectadas com 5×10^5 de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Após 3h de infecção, as células foram lavadas e tratadas com AC nas concentrações de 5, 10, 25 e $50 \mu\text{g/mL}$ por 24h, conforme descrito por Machado e colaboradores (2020). Após o tempo de tratamento os sobrenadantes das células foram coletados e armazenados à -80°C para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico. As lâminas foram montadas para análise em microscópio de luz (E100, Nikon- LED). Imagens representativas do experimento foram capturadas. As células foram analisadas em microscópio de luz na objetiva 100X (E100, Nikon-led).

Determinação dos níveis de citocinas

O nível das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-10, MIF e TGF- β presentes no sobrenadante das células infectadas foram analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (eBiosciences®, EUA). As placas foram lidas a 450nm usando o leitor de placas (Thermo Scientific, Multiskan GO).

Determinação de nitrito como estimativa dos níveis de Óxido Nítrico

Para avaliar a produção de óxido nítrico, alíquotas de 50 μL do sobrenadante do ensaio de viabilidade do parasito e da infecção experimental foram utilizadas para dosagem e adicionadas a 50 μL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato de ácido ortofosfórico 5%), assim como descrito anteriormente por Tomiotto-Pelissier e colaboradores (2018). A absorbância foi lida a 550nm em um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO).

Determinação estimativa dos níveis de Espécies reativas de oxigênio (ERO)

A alteração na formação de ERO foi avaliada por meio da sonda 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Sigma Aldrich). Para isto, 1×10^6 de taquizoítas foram tratados com as concentrações de 5 e $10 \mu\text{g/mL}$ de AC por 1h. Após o tempo de tratamento foi adicionado 10 μL da sonda e mantido por 45 minutos a 37°C ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em fluorímetro com 488 nm de excitação e 530nm de emissão (Victor X3, PerkinElmer). H₂O₂ (0,4%) utilizado como controle positivo .

Determinação de potencial de membrana mitocondrial

Conforme descrito por Sanfelice e colaboradores (2021), 1×10^6 de taquizoítas de *T. gondii* foram tratados com 5 e $10 \mu\text{g/mL}$ de por 1h. Após este período foi realizada a marcação com éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE - 25nM) (Sigma Aldrich). A leitura foi realizada em fluorímetro em 488 nm de excitação e 530 nm de emissão (Victor X3, PerkinElmer). Como controle positivo foi utilizado Carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP).

Determinação de corpos lipídicos por vermelho do Nilo

Conforme a metodologia descrita por Sanfelice e colaboradores (2021), taquizoítas (1×10^6) foram tratados com 5 e $10 \mu\text{g/mL}$ de AC por 1h e em seguida marcados com vermelho do Nilo (Sigma Aldrich). A leitura foi realizada em fluorímetro em 488 nm de excitação e 530 nm de emissão (Victor X3, PerkinElmer). PBS foi utilizado como controle positivo.

Investigação da formação de vacúolos autofágicos

Taquizoítas de *T. gondii* (1×10^6) foram tratados com 5 e $10 \mu\text{g/mL}$ de AC por 1h e marcados com monodansilcadaverina (Sigma Aldrich) de acordo com Sanfelice e colaboradores (2021). A leitura foi realizada em fluorímetro em 488 nm de excitação e 530 nm de emissão (Victor X3, PerkinElmer). PBS foi utilizado como controle positivo.

Determinação da exposição à fosfatidilserina e integridade da membrana celular

A análise de exposição de fosfatidilserina, como evento sugestivo de apoptose, foi detectada usando Anexina-V FITC (Invitrogen) e a integridade da membrana celular dos parasitos foi avaliada através da marcação com iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich) conforme descrito anteriormente por Bortoleti e colaboradores (2018). Taquizoítas (1×10^6) foram tratados com AC 5 e $10 \mu\text{g/mL}$ por 1h a 37°C , parasitos não tratados foram usados como controle negativo. A leitura foi realizada em fluorímetro em 520 nm de excitação e 492 nm de emissão (Victor X3, PerkinElmer).

Avaliação morfológica de taquizoítas por microscopia eletrônica de varredura

A fim de analisar as alterações na superfície do parasito foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os taquizoítas (1×10^6) foram tratados com

AC (5 µg/mL) por 1 h a 37°C. Após o tratamento, foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. As amostras prontas foram colocadas em lâminas contendo poli-L-lisina, posteriormente foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (30-100%) e feita secagem final em câmara de ponto crítico (Baltec SCD-030). Por fim, foi realizada metalização com ouro e feita visualização em alta resolução através de microscópio eletrônico de feixe duplo FEI SCIOS (Fei Company).

Análise estatística

Os resultados foram obtidos por meio de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre tratamentos e controles foram avaliados por análise de variância (One way ANOVA) seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando software GraphPad Prisma 8 (GraphPad Software, Inc.). A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

AC apresenta baixa toxicidade em células HTR8/Svneo e reduz a viabilidade de taquizoítas de *T. gondii*

A fim de verificar se o composto alteraria a viabilidade celular, células HTR8/Svneo foram tratadas com AC (10-10000µg/mL). Não houve alteração de viabilidade celular até a concentração 200µg/mL (**Figura 1A**). A partir desse resultado foi calculada a concentração citotóxica de 50% (CC 50), obtendo valor de 1950µg/mL. Para avaliar o efeito direto do tratamento em formas taquizoítas foram selecionadas concentrações de AC que não apresentaram toxicidade nas células HTR8/SVneo (1-200µg/mL). Houve redução significativa em todas as concentrações testadas, taquizoítas tratados com AC apresentaram redução de 18,13% (1µg/mL), 66% (10µg/mL), de 72,5% (50µg/mL), >78% (100-150µg/mL) e de 88% (200µg/mL) (**Figura 1B**). Após este ensaio foi calculada a concentração inibitória de 50% (CI 50) a qual foi de 5µg/mL ± 0.05.

Devido a baixa toxicidade observada em células HTR8/SVneo e atividade efetiva contra taquizoítas de *T.gondii*, calculamos o índice de seletividade (IS) afim de constatar se o composto realmente era seletivo para o parasito sem apresentar seletividade para a célula, e obtivemos o valor de 390.

1.

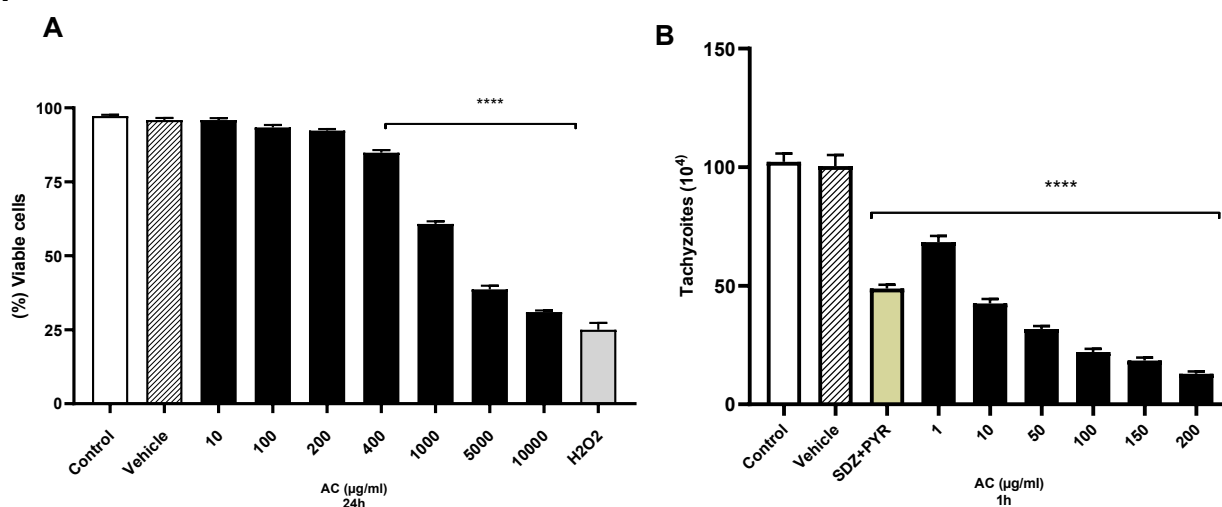


Figura 1 – AC tem baixa toxicidade em células HTR8/Svneo e possui efeito sobre a viabilidade de formas taquizoítas de *T. gondii*. Células HTR8/Svneo foram tratadas por 24h com AC (10-10000µg/mL). Células somente com meio RPMI 1640 foram utilizadas como controle negativo, H₂O₂ foi utilizado como controle positivo e etanol como controle do veículo (**Fig.1A**). Taquizoítas tratadas por 1h com AC (1-200µg/mL). O grupo tratado com SDZ+PYR (50 e 25µg/mL respectivamente) foram utilizados como controle positivo enquanto que os somente com meio RPMI 1640, sem tratamento foram usados como controle negativo. Taquizoítas tratados com etanol foram utilizados como controle do veículo (**Fig. 1B**). Os valores representam a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças significativas do controle negativo **** (p<0,0001).

AC reduz invasão e proliferação de taquizoítas e *T. gondii* em células HTR8/Svneo

Em seguida analisamos a capacidade do composto em reduzir a infecção e/ou a proliferação em células HTR8/Svneo. O ensaio de infecção demonstrou que o AC reduziu o número de taquizoítas 55% na concentração de 5µg/mL, 66% na concentração 10µg/mL, 76,5% e 80,5% nas concentrações 25µg/mL e 50µg/mL, respectivamente quando comparados ao grupo controle sem tratamento (p<0,0001) (**Figura 2A**). O ensaio de proliferação demonstrou redução em 32,5% (5µg/mL), 37,5% (10µg/mL), 40,75% (25µg/mL) e 54% (50µg/mL), quando comparados ao grupo controle (p<0,0001) (**Figura 2B**).

Imagens representativas de microscopia ótica obtidas do mesmo ensaio corroboram com o resultado, demonstrando que o tratamento com AC nas concentrações de 5,10, 25 e 50µg/mL reduziram de forma proporcional o número de parasitos conforme o aumento da concentração (**Figura 3C-F**).

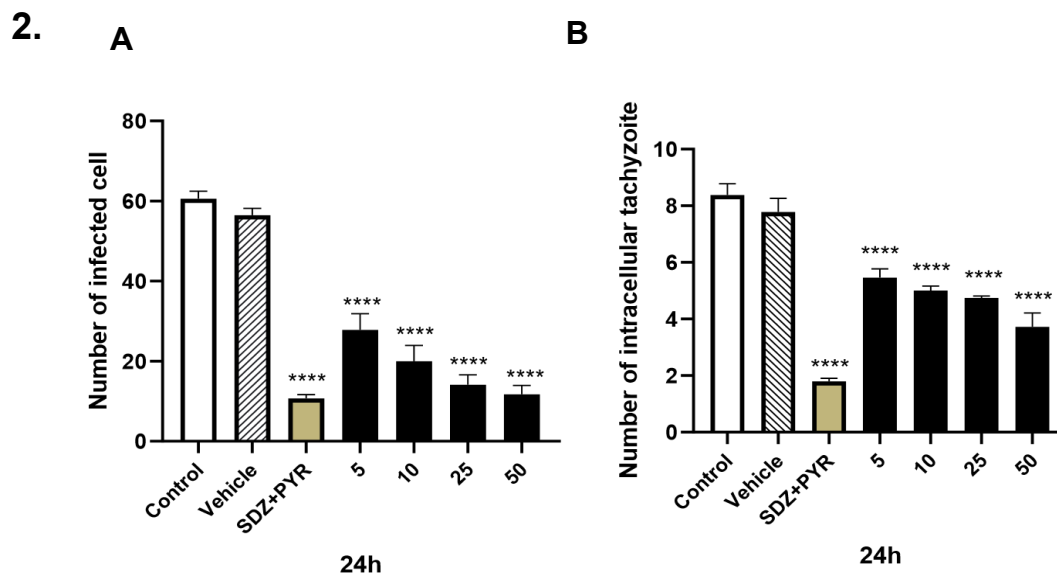


Figura 2. Tratamento com AC promove redução de infecção e proliferação de taquizoitas em células HTR8/SVneo. Células HTR8/SVneo infectadas com taquizoitas de *T. gondii* foram tratadas com AC (5, 10, 25 e 50µg/mL) por 24h. Posteriormente foram calculados índices de infecção (Fig.2A) e proliferação (Fig.2B). Controle positivo SDZ+PYR (25 e 50µg/mL, respectivamente). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças significativas do controle negativo **** ($p < 0,0001$).

3.

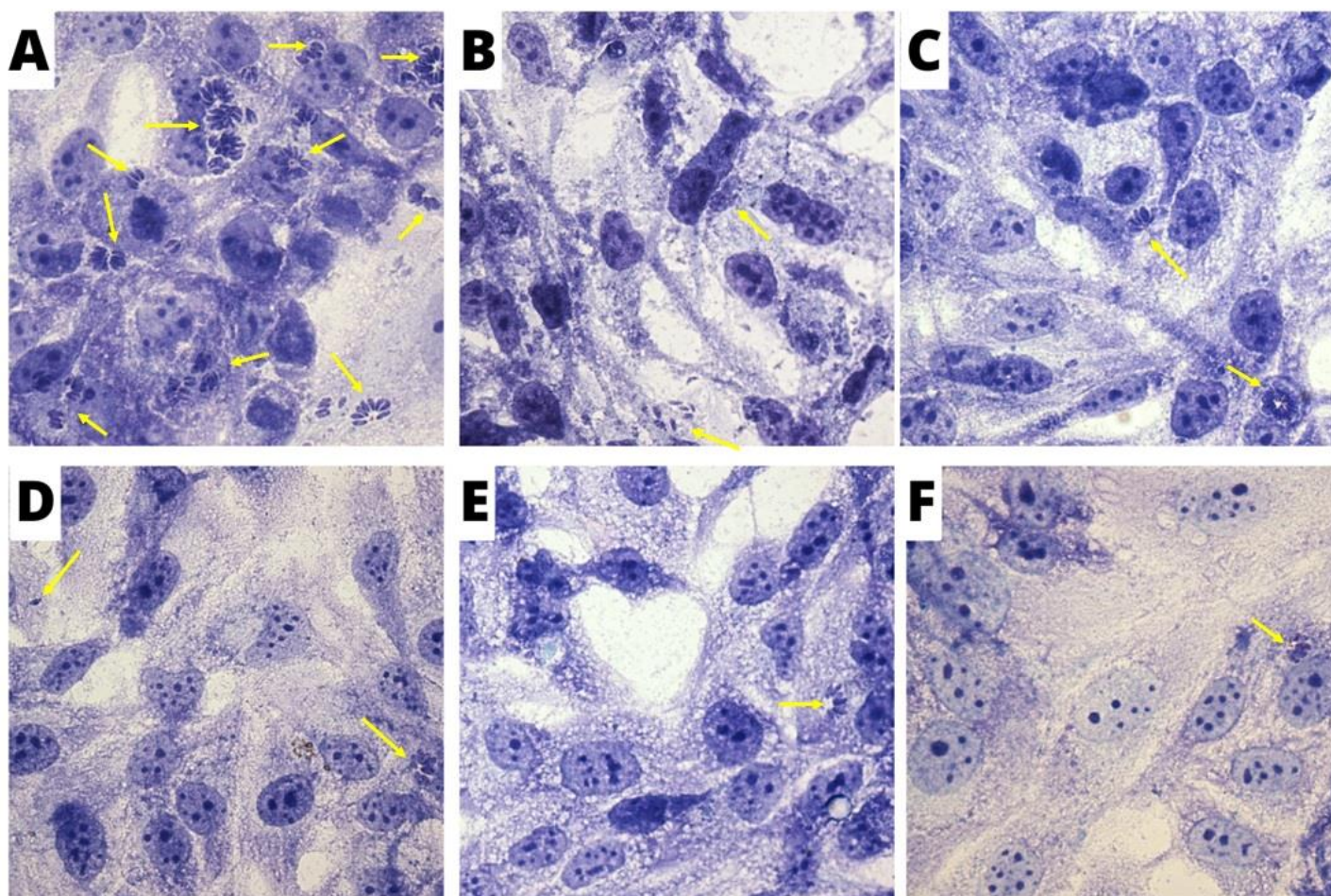


Figura 3. Imagens de microscopia ótica do ensaio de infecção experimental. Células HTR8/SVneo infectadas com taquizoitas de *T. gondii* sem tratamento (A). Controle positivo, tratamento com SDZ+PYR (50 e 25µg/mL) (B). Células HTR8/SVneo infectadas com *T. gondii* e tratadas com AC em 5µg/mL (C); 10µg/mL (D); 25µg/mL (E); 50µg/mL (F). As setas amarelas indicam taquizoitas. Aumento de 1000x.

AC induziu a produção de citocinas IL-1 β , MIF e TGF- β em células HTR8/SVneo infectadas por *T. gondii*

A fim de verificar a influência do composto na produção de citocinas, essas foram dosadas, houve um aumento gradual na produção de IL-1 β e TGF- β em todas concentrações analisadas quando comparadas ao controle infectado e ao nível basal da célula (**Figura 4A-B**). Quanto a produção de MIF, houve aumento gradual na produção com diferença estatística significativa em todas as concentrações exceto 5 μ g/mL (**Figura 4C**). A liberação das citocinas IL-10 e TNF- α nos grupos tratados com AC não apresentaram diferenças estatísticas (**Figura 4D-E**).

4.

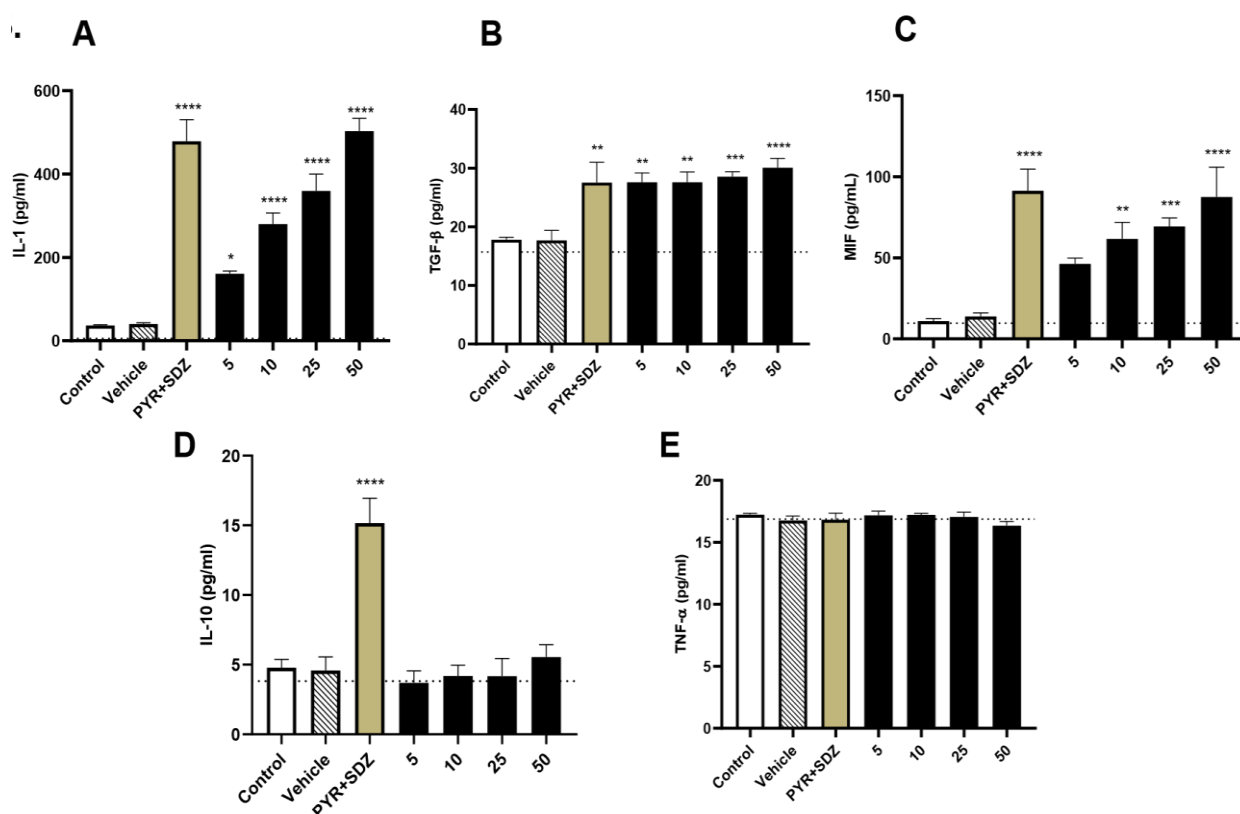


Figura 4. AC possui atividade na produção de citocinas IL-1, MIF e TGF- β . Níveis de citocinas dosadas do sobrenadante de cultura das células HTR8/SVneo infectadas e tratadas com AC. Como controle foram considerados: nível basal de células HTR8/SVneo sem infecção (linha tracejada), células HTR8/SVneo infectadas com taquizoítas de *T. gondii* sem tratamento (controle infectado), células HTR8/SVneo tratadas com etanol (controle de veículo) e células HTR8/SVneo infectadas com *T. gondii* e tratadas com sulfadiazina e pirimetamina (50 e 25 μ g/mL) (controle positivo). Os valores representam média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças significativas do controle negativo * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

AC induziu aumento da produção de NO e ERO e induz a formação de gotículas lipídicas em taquizoítas de *T. gondii*

Posteriormente foi analisado se o composto alterava a produção de NO e ERO e se

teria capacidade de induzir a formação de gotículas lipídicas no parasito. Observou-se que o tratamento com AC aumentou a produção de NO em células infectadas (**Figura 5A**) e no parasito (**Figura 5B**), quando comparadas ao controle negativo. Quando analisada a produção de ERO no parasito foi observado aumento significativo na concentração de 10 μ g/mL (**Figura 5C**). Houve também aumento da formação de corpos lipídicos intracelulares (**Figura 5D**).

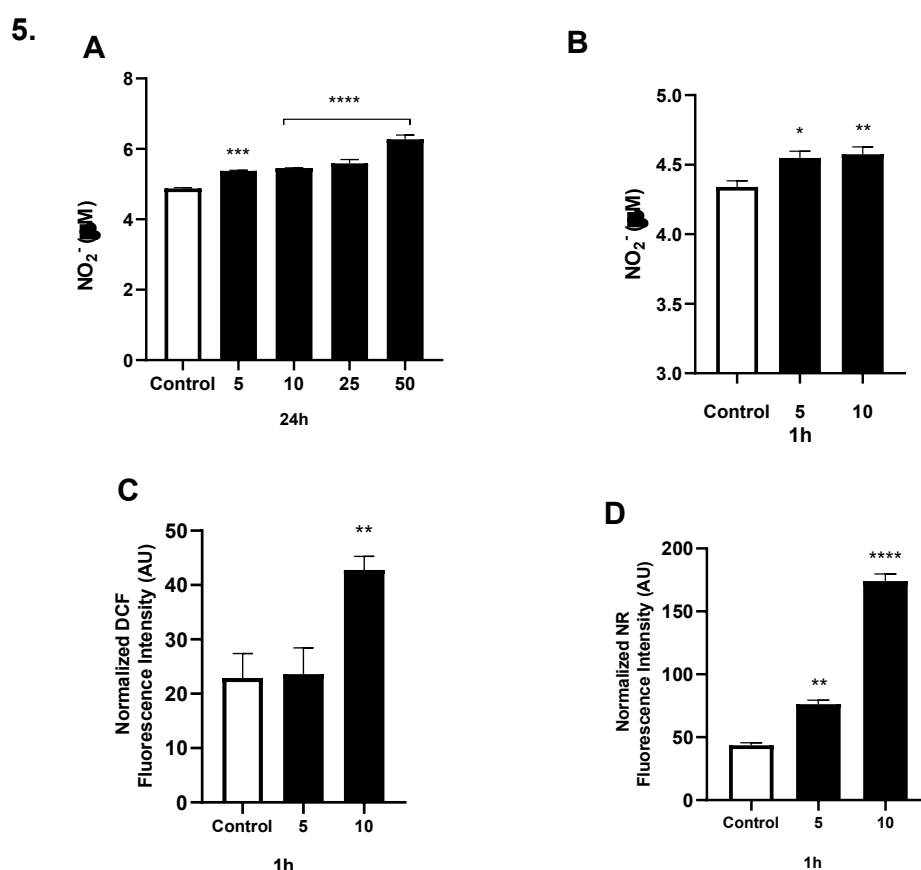


Figura 5. Ácido cafeico induz estresse metabólico em taquizoítas livres de *T. gondii*. Taquizoítas de *T. gondii* tratados com AC por 1h (5 e 10 μ g/mL) ou por 24h nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μ g/mL. Método de Griess para avaliação de níveis de nitrito em célula HTR8/SVneo infectada (**Fig.5A**) e em taquizoítas livres tratados com AC (**Fig.5B**). Determinação de ERO total por sonda fluorescente (**Fig.5C**). Marcação de gotículas lipídicas por vermelho do Nilo (**Fig.5D**). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças significativas do controle negativo * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

AC promove eliminação de taquizoítos através de morte por apoptose devido a perda da integridade mitocondrial e processo autofágico em taquizoítas de *T. gondii*

Na avaliação do potencial de membrana mitocondrial observamos que o grupo tratado com AC apresentou diminuição da intensidade de fluorescência quando comparado com o controle, indicando perda de integridade desta organela (**Figura**

6A). Quanto a indução de autofagia, houve aumento da intensidade da marcação com monodansilcadaverina, resultado sugestivo de processo autofágico (**Figura 6B**). Por fim para determinar o tipo de morte que oAC induz nos taquizoítas foi realizado tratamento por 1h, posteriormente os parasitos foram marcados e obtivemos como resultado aumento da marcação por Anexina V (**Figura 6C**) e aumento significativo na marcação de iodeto de propídeo, resultados que em conjunto sugerem que a morte dos parasitos ocorreu por apoptose (**Figura 6D**).

6.

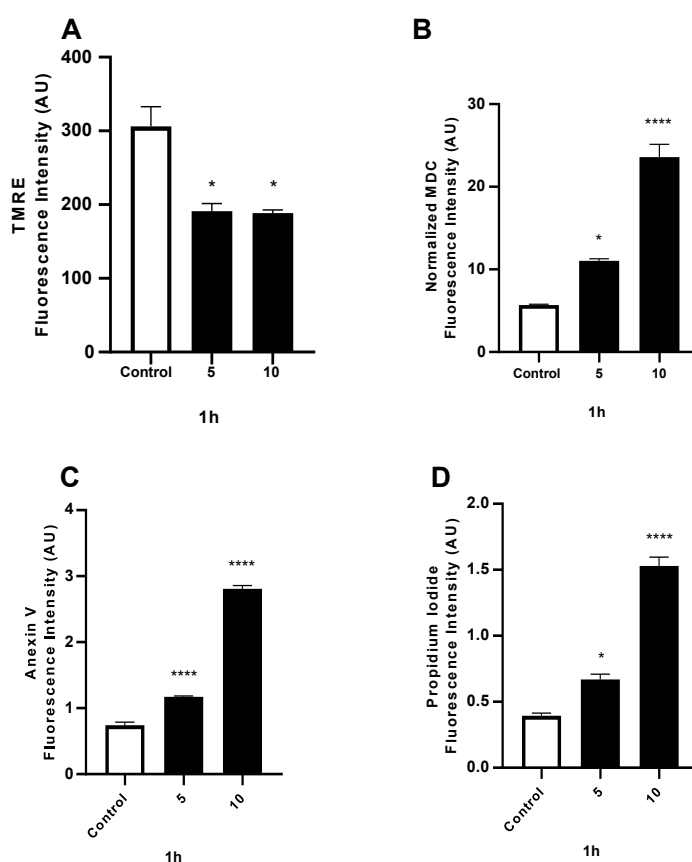


Figura 6. Processo de morte em taquizoítas induzidos por AC. Taquizoítas de *T. gondii* tratados com AC por 1h (5 e 10µg/mL). Avaliação da integridade da membrana mitocondrial por ensaio TMRE (**Fig.6A**). Quantificação de vacúolos autofágicos por MDC (**Fig.6B**). Exposição de fosfatidilserina por marcação de Anexina V (**Fig.6C**) e análise da integridade da membrana plasmática com iodeto de propídeo (**Fig.6D**). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças significativas do controle negativo * ($p < 0,05$), **** ($p < 0,0001$).

AC promove alteração na morfologia de taquizoítas

A análise de microscopia eletrônica de varredura mostra que o tratamento com AC acarretou em extravazamento de conteúdo citoplasmático e danos na membrana plasmática após 1 hora de tratamento. As alterações foram observadas

em ambas concentrações testadas, 5µg/mL (**Figura 7C-D**) e 10µg/mL (**Figura 7E-F**).

7.

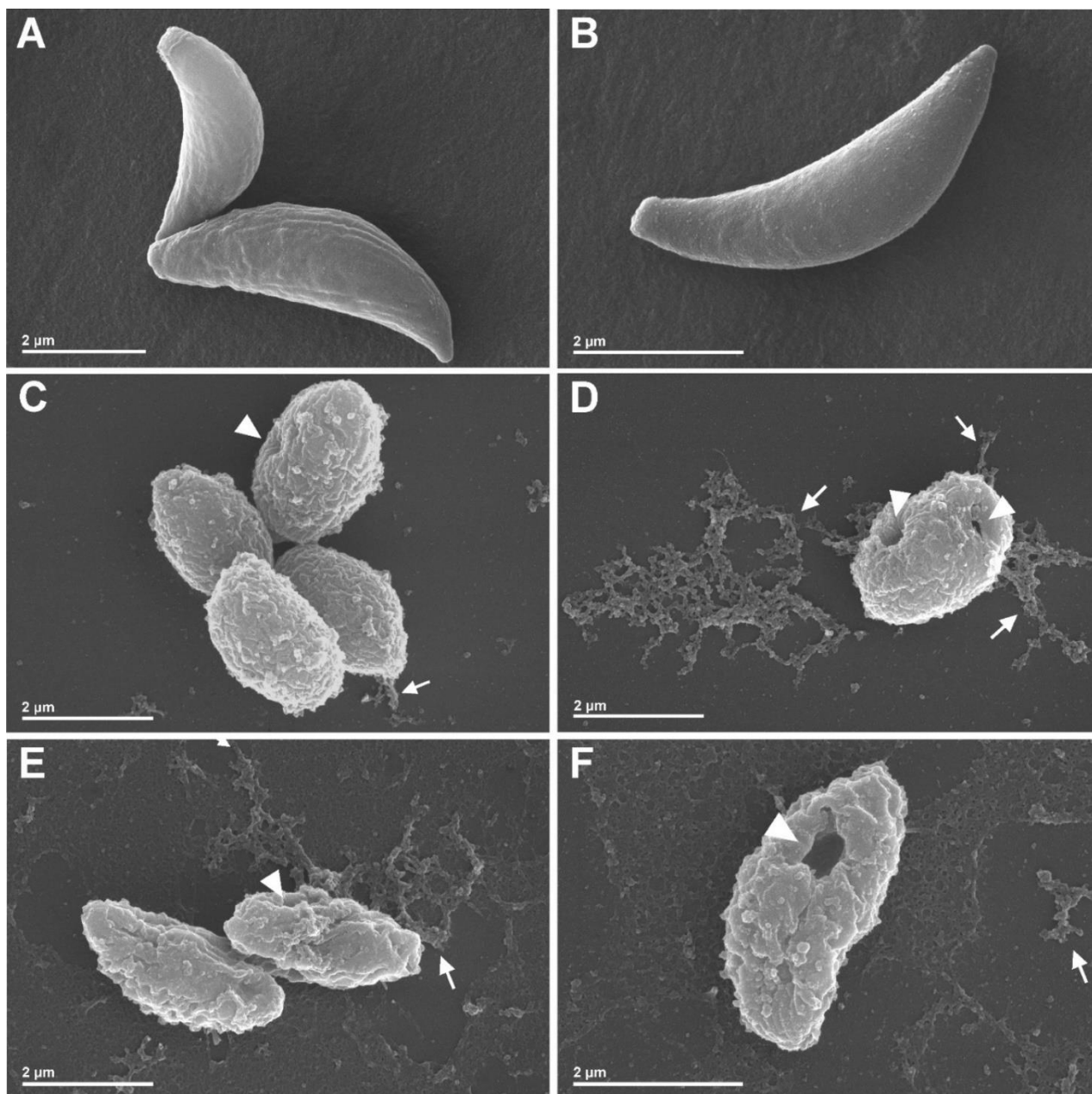


Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* foram tratados com 5 e 10 µg/ml de AC por 1 h e analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (Fig.7A-B) taquizoítas não tratados; (Fig.7C-D) taquizoítas tratados com 5 µg/ml de ácido cafeico; (Fig.7E-F) taquizoítas tratados com 10 µg/ml de ácido cafeico. Seta branca indica vazamento de conteúdo citoplasmático; cabeça de seta branca indica dano à membrana plasmática. Barras de escala = 2 µm.

DISCUSSÃO

A necessidade da busca de novos compostos para tratamento da toxoplasmose congênita é de grande relevância tendo em vista a terapêutica atual disponível e a gravidade da infecção em gestantes. Sulfadiazina e pirimetamina, apesar do seu efeito anti-*Toxoplasma*, são altamente tóxicos, trazendo riscos para a gestante e para o feto

(MONTROYA E REMINGTON, 2008; PIAO, 2018). Por esse motivo, o tratamento ideal deve ter como característica ser efetivo contra o parasito e ao mesmo tempo não apresentar toxicidade para o paciente. Nesse sentido, compostos naturais são indicados por apresentarem, em sua maioria, efeitos anti-proliferativos contra parasitos.

No presente estudo, AC se apresentou como potencial candidato para novos estudos que visam o desenvolvimento de terapias para toxoplasmose congênita por diversos motivos. Dentre esses, o fato do composto não apresentar toxicidade em células HTR8/Sv-neo até a concentração de 200µg/mL. Dados similares também foram observados por Kostić e colaboradores (2022), utilizando a mesma linhagem celular e AC até a concentração de 100µg/mL. Além disso, Bortoleti e colaboradores (2019) também demonstraram a baixa toxicidade do composto que manteve a viabilidade de macrófagos peritoneais e eritrócitos murinos.

A partir desses dados foi realizado o cálculo de IS, cujo resultado foi de 390, esse cálculo têm sua importância por indicar a seletividade do tratamento em relação parasito/célula. Até o momento não são bem estabelecidos parâmetros de referência específicos para *T.gondii*, porém Deng e colaboradores (2020) afirmam que quanto maior o valor de IS, melhor seria o efeito deste composto contra *T. gondii*, no mesmo trabalho os autores chegaram ao valor de IS=6,44, considerado pelos autores como um bom resultado.

Em continuidade, foi verificado que o AC foi eficaz em reduzir os índices de invasão e proliferação em células HTR8/SVneo infectadas em todas as concentrações testadas, os resultados obtidos corroboram com Bortoleti e colaboradores (2019) que apresentaram resultado similar utilizando AC em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* e Belkhef-Slimani & Djerdjourique (2017) em infecção por *Leishmania major*. Esses resultados podem ser elucidados devido às alterações diretas e indiretas que o composto acarreta aos parasitos em questão. De acordo com achados da literatura, AC foi capaz de promover em microorganismos, indução de apoptose, redução da disponibilidade de ferro, essencial para replicação de alguns microorganismos, indução da produção de moléculas microbidas como NO e ERO, dano em estrutura de proteínas e de DNA e capacidade de modulação da síntese de mediadores inflamatórios (OTERO et al. 2017; ALSON et al. 2018; BORTOLETI et al. 2019; KHAN et al. 2021).

É estabelecido que o sucesso de uma gestação depende de inúmeros fatores, entre os mais importantes se encontra o delicado equilíbrio imune. Modelos experimentais já mostraram que trofoblastos são células componentes do sistema imune inato, capazes de reconhecer patógenos e produzir quimiocinas e citocinas (ZHANG et al. 2018). Neste estudo, observamos que AC induziu aumento significativo de citocinas pró inflamatórias como MIF e IL-1 β . Essas interleucinas tem papel muito importante na resposta contra a infecção, visto que atuam indiretamente na eliminação do parasito. Porém, Zhang e colaboradores (2018) demonstraram que durante a infecção por *T.gondii* na gestação ocorre a diminuição dos níveis de IL-1 β , o que pode afetar o equilíbrio imunológico do microambiente na interface materno-fetal, interferindo no desenvolvimento placentário e contribuindo para o desenvolvimento anormal do feto. (BORGES et al. 2018; ZHANG et al. 2018). Não é esclarecido até o momento o motivo dessa diminuição, porém pode-se inferir que ela ocorre devido ao fato de que uma resposta exacerbada pode ser prejudicial ao hospedeiro podendo inclusive ter como consequência o aborto. Quando analisada a atividade do AC, os resultados demonstram sua capacidade de aumentar a resposta pró-inflamatória, como também observado por Bortoleti e colaboradores (2019), característica importante para eliminação do parasito e controle da infecção.

O Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF), é uma citocina secretada por células trofoblásticas e possui grande relevância no contexto materno-fetal. A importância desse componente já foi relatada em diversos trabalhos, que demonstraram que sua presença pode estar ligada à idade gestacional, sendo maior no primeiro trimestre de gestação e tendo diminuição no último, o que pode ser uma das explicações para o fato de ocorrer mais facilmente a passagem da infecção para o feto no terceiro trimestre (FERRO et al.2008; COSTA et al.2021). Observamos que AC promoveu um aumento significativo na produção dessa citocina, a qual a presença está muito relacionada com o controle da replicação do parasito, sugerindo portanto que os níveis aumentados de MIF aqui observados podem estar ligados ao controle da proliferação (BARBOSA et al. 2015; COSTA et al. 2021).

Os dados demonstraram que o AC não induziu aumento significativo de TNF- α , citocina pró-inflamatória produzida de forma acentuada durante a infecção por *T.gondii* que atua contra microrganismos intracelulares. Entretanto, esses dados são importantes quando avaliada uma linhagem celular trofoblástica uma vez que níveis

aumentados dessa citocina são capazes de levar a destruição de trofoblastos (PIAO et al. 2018).

Além disso no presente estudo foi verificado que AC não influenciou na produção de IL-10, porém induziu um aumento de TGF- β . Clark (2001) relata que níveis diminuídos de citocinas como TGF- β e IL-10 podem por meio da geração de trombina, proteína que converte fibrinogênio em fibrina, e levar à necrose na interface materno-fetal e conseqüente prejuízo na nutrição e desenvolvimento placentário. Além disso, trabalhos mostram que a infecção por *T.gondii* durante a gravidez faz com que haja uma regulação negativa de TGF- β e diminuição da produção de IL-10 (PIAO, et al. 2018). Portanto os dados obtidos nesse trabalho sugerem que AC pode atuar de forma benéfica durante a infecção congênita, induzindo uma regulação positiva de TGF- β , reestabelecendo a produção dessa citocina e não interferindo na produção de IL-10.

Já é bem estabelecido que durante a gravidez a liberação de citocinas pró e antiinflamatórias são de grande importância para manter o equilíbrio do microambiente placentário (BORGES, et al. 2019) nossos resultados em conjunto mostram que AC tem capacidade de regular essas citocinas contribuindo para manutenção do equilíbrio no microambiente placentário.

Foi verificado também que AC induz a produção de moléculas microbidas essenciais para controle da infecção como NO, responsável por diminuir a proliferação de *T.gondii*, que ocorre devido à característica da molécula de inibir enzimas mitocondriais e nucleares essenciais do parasito, levando à morte de taquizoítas (DAMASCENO-SÁ et al. 2021). Quanto à produção de ERO, houve aumento significativo somente na concentração de 10 μ g/mL, isso pode ter ocorrido devido a diversos fatores, como tempo de tratamento e concentração utilizada (KADAR et al. 2021). De maneira semelhante, Bortoleti e colaboradores (2019) também demonstraram que o composto induziu aumento da produção de ERO em promastigotas de *L.amazonensis* e aumento da produção de NO em macrófagos infectados.

Os resultados apontam que, além dos mecanismos de ação indiretos do AC promover a destruição do parasito, este composto também foi capaz de agir diretamente sobre os taquizoítas de *T. gondii* uma vez que foi capaz de gerar danos na membrana

plasmática, perda da integridade mitocondrial, formação de corpos lipídicos e processo autofágico que são características indicativas de estresse metabólico que associado aos demais fatores supracitados geram a morte do parasito. Como já citado anteriormente embasados na literatura que o AC apresentou também, em outros parasitos, mecanismos de ações semelhantes às descritas neste trabalho corroborando com os dados aqui obtidos. Entretanto, este trabalho é pioneiro em destacar e mostrar a importância e relevância do AC e suas ações frente à infecção de células de origem trofoblástica infectadas com *T. gondii*.

Diante do exposto, os dados aqui apresentados mostram que o composto não apresentou toxicidade para as células em baixas concentrações porém foi efetivo contra o parasito tanto em sua forma livre quanto em modelo de infecção experimental, com capacidade de levar a danos diretos em *T.gondii* e induzir produção de citocinas e moléculas microbidas. Consideramos que esse trabalho possa permitir novas investigações a cerca da interface materno fetal e de novos estudos utilizando AC contra a infecção por *T.gondii*.

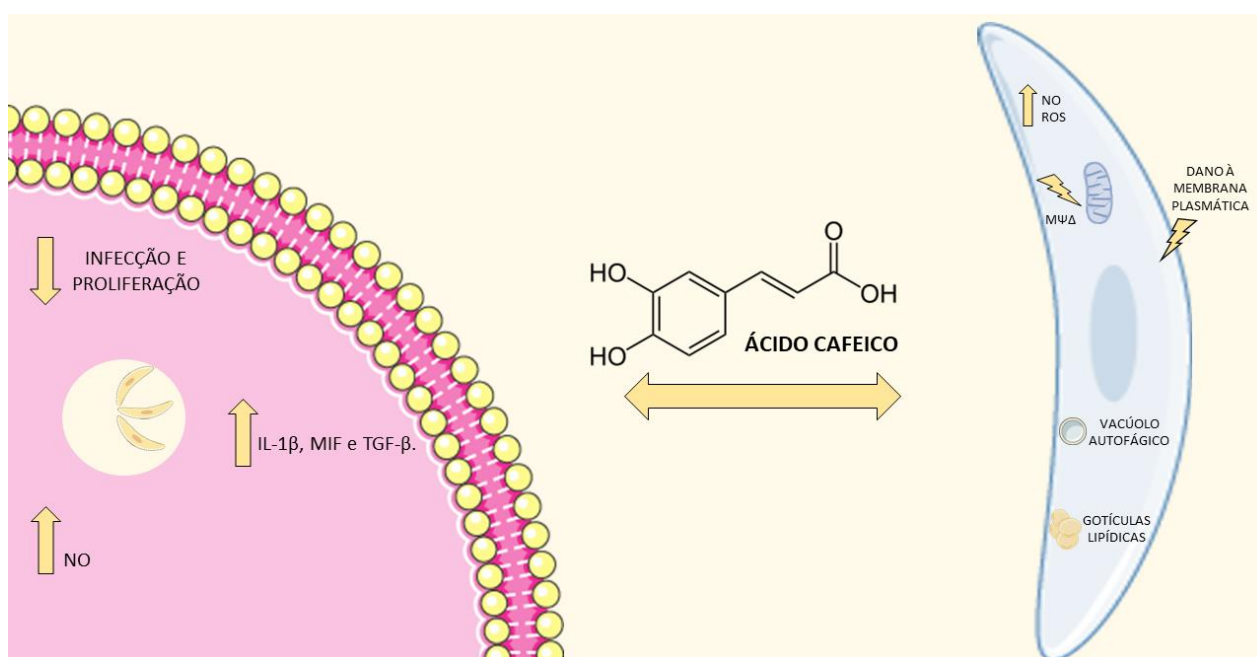


Figura 8. Resumo dos principais resultados obtidos em células infectadas e taquizoítas livres.

REFERÊNCIAS

ALSON, S.G.; JANSEN, O.; et al. In-vitro and in-vivo antimalarial activity of caffeic acid and some of its derivatives. *J Pharm Pharmacol.* 2018.

BARROS, R.A.M.; TORRECILHAS, A.C. et al. *Toxoplasmosis in Human and Animals Around the World. Diagnosis and Perspectives in the One Health Approach, Acta Tropica,* 2022.

BELKHELFA-SLIMANI, R.; DJERDJOURI, B. Caffeic acid combined with autoclaved *Leishmania major* boosted the protection of infected BALB/c mice by enhancing IgG2 production, IFN- γ /TGF- β and iNO synthase/arginase1 ratios, and the death of infected phagocytes. *Inflammopharmacology*. 2018.

BORGES, M.; MAGALHÃES, S.T. et al. Como a toxoplasmose afeta a interface imune materno-fetal e a gravidez? *Parasite Immunol*. 2019.

BORTOLETI B.T.S., GONÇALVES, M.D. et al. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. *Phytomedicine*, 2018.

BORTOLETI, B.T.S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Caffeic acid has antipromastigote activity by apoptosis-like process; and anti-amastigote by TNF- α /ROS/NO production and decreased of iron availability, *Phytomedicine*, 2019.

COSTA, I.N.; et al., Biogenic silver nanoparticles can control *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblast cells and villous explants. *Frontiers in Microbiology*, 2021.

DAMASCENO-SÁ, J.C. et al. Inhibition of nitric oxide production of activated mice peritoneal macrophages is independent of the *Toxoplasma gondii* strain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2021.

DENG, H., HUANG, X. et al. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of dihydroartemisinin derivatives with potential anti-*Toxoplasma gondii* agents. *Bioorganic Chemistry*, 2020.

DJAKOVIC O.D. et al. Toxoplasmosis: Overview from a one health perspective, 2019.

DUBEY, J.P.; et al. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology*, 2021.

ESPINDOLA, K. M. M.; et al. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Frontiers in oncology*, 2019.

KADAR, N.N.M.A. et al. Caffeic Acid on Metabolic Syndrome: A Review. *Molecules* 2021.

KHAN, F.; et al. Caffeic acid and its derivatives: antimicrobial drugs toward microbial pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021.

KIM, Y.H.; et al. Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats. *Journal of exercise rehabilitation*, 2014.

KOSTIĆ, S. et al. Caffeic acid protects human trophoblast HTR-8/SVneo cells from H₂O₂-induced oxidative stress and genotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2022.

MACHADO, L.F. et al. Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of *Toxoplasma gondii* RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction. *Experimental Parasitology*. 2020.

MIRANDA-SAPLA, M.M. et al. Trans-Chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection *in vitro* by Nrf2 overexpression affecting iron availability. *The European Journal of Pharmacology*. 2019.

MOLINA, D.A. et al. *In vitro* evaluation of new 4-thiazolidinones on invasion and growth of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2021.

MONTOYA, J.G.; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin. Infect. Dis. 2008.

OTERO, E. et al. Triclosan-caffeic acid hybrids: Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities. Eur J Med Chem. 2017.

PIAO, L.X. et al. Cellular immunopathogenesis in primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Parasite Immunol. 2018.

SANFELICE, R.A. et al. Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. Acta Tropica. 2017.

SANFELICE, R.A. et al. 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. 2021.

SMITH, N.C.; et al. Control of human toxoplasmosis, International Journal for Parasitology, 2021.

ZHANG, Y.; LAI, B.S.; JUHAS, M.; ZHANG, Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. Microbiol Res. 2019.

5. CONCLUSÃO GERAL

Nosso estudo demonstrou que AC não apresentou toxicidade em baixas concentrações em células HTR8/Svneo, porém foi capaz de reduzir a viabilidade de taquizoítas livres ocasionando perda da integridade da membrana mitocondrial, formação de gotículas lipídicas e aumento de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, alterações essas decorrentes do tratamento direto com ácido cafeico. Além disso o composto reduziu a infecção e a proliferação de *T. gondii* em células trofoblásticas desencadeando o aumento da produção de citocinas e óxido nítrico nas células. Por fim foi verificado que o composto acarretou em processo de morte celular, com autofagia e processo sugestivo de morte por apoptose.

Diante disso o presente estudo abre possibilidades e permite novas investigações a cerca da interface materno fetal e do uso do AC como potencial candidato para novos estudos que visam o desenvolvimento de terapias para toxoplasmose congênita.