

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PEDRO ANTONIO MORAES SOUZA

**Avaliação dos efeitos antiparasitários dos Compostos Químicos Sintéticos,  
RVI30 e RVI33, contra *Toxoplasma gondii***

Uberlândia - MG

Abril, 2023

PEDRO ANTONIO MORAES SOUZA

**Avaliação dos efeitos antiparasitários dos Compostos Químicos Sintéticos,  
RVI30 e RVI33, contra *Toxoplasma gondii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia

Orientador: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Coorientador: Mestre Alessandra Monteiro Rosini

Uberlândia - MG

Abril, 2023

PEDRO ANTONIO MORAES SOUZA

**Avaliação dos efeitos antiparasitários dos Compostos Químicos Sintéticos,  
RVI30 e RVI33, contra *Toxoplasma gondii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Graduação em  
Biomedicina, Instituto de Ciências Biomédicas,  
da Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Imunologia e  
Parasitologia

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, ICBIM, UFU

Profa. Dra. Rosiane Nascimento Alves, Universidade Estadual de Minas Gerais (UEMG)

Dra. Priscila Silva Franco, UFU

Uberlândia – MG

Abril, 2023

Dedico este trabalho a todas as pessoas grávidas as quais, possivelmente, necessitem de fazer terapia anti *T. gondii*, que possam em um futuro próximo, usufruir de seus frutos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a professora Bellisa, pela oportunidade de trabalhar com ela e frequentar o laboratório.

A todos do laboratório de Imunofisiologia da reprodução que me apoiaram, ensinaram e trabalharam comigo, Aryani, Clara, Guilherme, Joed, Rafael, Natalia e Marina.

A Alessandra por ser uma ótima co-orientadora sempre presente e ativa no processo.

Ao Samuel, que já tinha sido meu professor em uma outra etapa da vida, e nessa também foi, de certa forma, um professor, que tem toda minha admiração e aspiração.

A professora Ana Paula que esteve presente e não foi somente uma ótima professora acadêmica, mas como uma ótima pessoa, que me acolheu em momentos de dificuldade.

Os agradecimentos também vão aos meus amigos que estiveram comigo durante toda essa etapa da graduação.

A meus amores AAA, Ágatha, Akemi e Alexia que sempre estiveram do meu lado, mesmo apesar da distância que a vida vem nos proporcionando.

Ágatha por ter compartilhado toda a vivência, anseios e ansiedade de nossos estilos de nossas árduas vidas Queer, a minha querida as(i/m)ática Akemi, que foi como uma irmã em muitos momentos e a Alexia, que foi quase uma psicóloga pra mim em muitos momentos de surto, mas também me ofereceu muito carinho e apoio durante esses anos.

Não posso esquecer de uma das únicas “crentes” que eu aguento né, a Laís, que me ajudou em muitos momentos de fragilidade.

Agradeço ao Breno Rafael e a Daniele Lopes por me tirarem da “caixinha” e me ajudarem a enxergar um novo mundo com novos horizontes, e que meu lugar não está restrito aqui.

Ao Diego, por caminhar comigo nesse novo mundo desde muito tempo atrás.

Devo um agradecimento especial também, aos meus queridos amigos e colegas de RPG, Aluan, Lais (de novo), Lucas e Vinícius. Vocês ajudaram a manter minha sanidade durante muito tempo, me permitindo fugir de uma realidade que me atormentava com vários fantasmas para lutar contra eles e vencê-los em uma fantasia maravilhosa (/roll 1d20).

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelas bolsas concedida durante os anos do curso.

**Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, por ser uma ótima universidade e que melhora constantemente.**

*“The nitrogen in our DNA, the calcium in our teeth, the iron in our blood, the carbon in our apple pies were made in the interiors of collapsing stars. **We are made of starstuff.**”*

*“I’ve been running on **stardust**... for so long...  
It’s strange, but it’s true...”*

*- Carl Sagan, Cosmos.*

*- Lana del Rey, Wildflower Wildfire.*

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório capaz de ultrapassar a barreira placentária, causando a toxoplasmose congênita, doença com graves complicações para o feto. O tratamento convencional para essa condição é a associação de sulfadiazina e pirimetamina, a qual possui efeitos colaterais graves, logo, é eminente a necessidade de se pesquisar novos fármacos e alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença. Tendo em vista isso, o presente estudo visou verificar a ação de dos compostos sintéticos, o RVI 30 e o RVI 33 na infecção por *T. gondii* em linhagens celulares humanas trofoblásticas. Os compostos foram testados na linhagem humana trofoblástica BeWo, para avaliar sua toxicidade através do teste de viabilidade celular. Posteriormente as células foram submetidas aos testes de proliferação, invasão e reversibilidade da infecção por *T. gondii*, sendo tratadas com os compostos como tratamento alternativo, no qual, os resultados foram obtidos por ensaios colorimétricos e expressos em porcentagem em relação as células não tratadas ou tratadas convencionalmente. Ao final das análises estatísticas, foi visto que estes compostos reduziram, significativamente, a proliferação e a invasão do parasita de forma dose dependente, e ambos RVIs foram capazes de reduzir de forma irreversível a proliferação intracelular do protozoário. Através desses resultados, pode-se concluir que esses compostos são novas possíveis estratégias para controlar a infecção por *T. gondii* em células da interface placentária humana. Frente a isso, é necessário investigar os mecanismos acionados pelos RVIs, assim como a resposta imune e possíveis mudanças morfológicas na estrutura dos parasitos.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose congênita; Tratamentos alternativos; Trofoblasto.



## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite capable of surpass the placental interface, causing the congenital toxoplasmosis, a disease that causes severe complications to the fetus. The conventional treatment for this condition is the association of sulfadiazine plus pyrimethamine that has harsh side effects, evidencing the need to research about new medicine and therapeutic alternatives to treat this disease. In sight of this, the present study aimed to verify the action of the synthetic compounds, RVI 30 and RVI 33 within the scenario of *T. gondii* infection in trophoblastic cell lineages. The two composts were tested in human trophoblast lineage BeWo, to evaluate its toxicity through the viability assay. Afterwards, the cells were subjected to the proliferation, invasion and reversibility tests during *T. gondii* infection, treated with the compounds as the alternative treatment, wherein the results were obtained with colorimetric assays and expressed as percentage in comparison with the no treatment cells or treated with the conventional drugs. By the end of the statistical analyses, the compounds significantly reduced proliferation and invasion of the parasite by a dose-dependent manner, and both RVIs were able to reduce irreversibly the intracellular proliferation of the protozoan. These results conclude that these composts are new possible strategies to control the *T. gondii* infection in the placental interface cells. In counterpart, it is necessary to investigate the mechanisms triggered by the RVIs, as well as the immune response and possible morphological changes in the structure of the parasites.

**Keywords:** Congenital toxoplasmosis, alternative treatments, trophoblast.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e epidemiologia da infecção .....	12
1.2 Resposta imune a <i>T. gondii</i> e perfil imunológico da gestação .....	13
1.3 Tratamentos alternativos e RVIs .....	14
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.1 Objetivos gerais .....	17
3.2 Objetivos específicos .....	17
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.1 Cultura das células BeWo .....	18
4.2. Manutenção dos parasitos .....	18
4.3 Diluição dos compostos .....	18
4.4. Ensaio de viabilidade celular .....	18
4.5. Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> .....	19
4.6. Ensaio de invasão parasitária .....	19
4.7. Ensaio de reversibilidade .....	19
4.8 Análise estatística .....	20
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 Toxicidade dos RVIs em concentrações maiores e DMSO não tóxico .....	21
5.2 Ensaio de proliferação intracelular do <i>T. gondii</i> nas células trofoblásticas .....	21
5.3 Ensaio de invasão por <i>T. gondii</i> .....	21
5.4 Ensaio de reversibilidade parasitária .....	21
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
<b>ANEXO 1: FIGURAS</b> .....	<b>30</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasma gondii* e epidemiologia da infecção

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Vários estudos mostram que cerca de um terço da população global está infectada por este protozoário (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013).

Responsável por causar a toxoplasmose, *T. gondii* possui três estágios infectantes: esporozoítos, bradizoítos e taquizoítos. Os esporozoítos provêm dos oocistos liberados nas fezes dos felídeos infectados, os bradizoítos podem ser ingeridos na carne malcozida de diversos hospedeiros intermediários, como aves, bovinos e suínos, e os taquizoítos podem ser transmitidos por transfusão sanguínea (SHEFFIELD; MELTON, 1968; KIM; WEISS, 2004).

O *T. gondii* pode atravessar a barreira placentária, infectando o feto e causando a toxoplasmose congênita, forma muito grave da doença que pode afetar o desenvolvimento normal da criança na gestação, podendo ocasionar abortos, má formações congênitas, entre outros problemas (GRANT, 1996).

O parasito possui um ciclo heteroxênico, ou seja, infecta o hospedeiro intermediário, no qual realiza reprodução assexuada, e um hospedeiro definitivo (felídeos), onde faz a reprodução sexuada. Esse último acontece nas células epiteliais intestinais dos felídeos, as quais liberam os oocistos juntamente com as fezes, que após a esporulação se torna infectante para o ser humano (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018).

A toxoplasmose é uma doença negligenciada. A partir da vigilância das doenças de transmissão hídrica e alimentar, foram constatados 25 surtos da toxoplasmose entre 2015 e 2020, sendo que dentre eles, foram notificados cinco óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

De acordo com estudos epidemiológicos em 2019, em Ivaiporã no Paraná, Brasil, foi revelado que em uma certa amostragem, cerca de 73% da população testada apresentava anticorpos anti-*T.gondii*, sendo que aproximadamente 68% das mulheres nessa mesma amostragem, consideradas em idade reprodutiva também apresentava os anticorpos (MAREZE et al., 2019).

Já outro estudo de 2011, demonstrou que no Brasil cerca de 5 a 23 casos de infecção congênita de toxoplasmose por 10.000 nascimentos (DUBEY et al., 2012). Em Minas Gerais a partir de dados coletados de 2009 à 2013, 235 recém-nascidos de uma amostra de 146.307 eram suspeitos para a toxoplasmose congênita e 190 foram confirmados (DUBEY et al., 2021).

A epidemiologia mundial da toxoplasmose varia bastante, mas em quase todos os dados obtidos, a infecção se mostra presente, inclusive na sua forma congênita. É visto que na

Colômbia, as infecções se assemelham ao padrão encontrado no Brasil. Já na África, a partir de dados coletados no Marrocos, cerca de 4 a 8 nascimentos a cada 10.000 são crianças infectadas congenitamente com o parasito. Em muitos países, como na Ásia e em outros países das Américas Central e do Sul não se tem muitas informações a cerca desses dados (EL BISSATI *et al.*, 2018; DUBEY *et al.*, 2021).

Além disso, o *Toxoplasma gondii* classicamente possui três cepas clonais diferentes, tipos I, II e III, diferenciadas através de uma eletroforese de enzimas-multilocus (HOWE; SIBLEY, 1995). Vários estudos já mostram que há uma diversidade clonal nas diferentes regiões do mundo e até mesmo dentro dessas, como por exemplo, no Brasil, onde várias cepas clonais estão juntas em grandes grupos denominados BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA *et al.*, 2008). O que torna o estudo epidemiológico e de tratamento da doença mais extenso e trabalhoso.

## **1.2. Resposta imune a *T. gondii* e perfil imunológico na gestação**

Nos estágios iniciais da infecção, a primeira linha de defesa é a imunidade inata, onde as células dendríticas, macrófagos e neutrófilos atuam liberando IL-12 a partir do reconhecimento via receptores do tipo Toll (TLRs), induzindo a síntese e liberação de IFN $\gamma$ , principalmente a partir das células *natural-killers* (NKs) (FISCH; CLOUGH; FRICKEL, 2019). As células T também possuem um importante papel nas reinfecções ou reativação das infecções crônicas, sendo que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> produzem grande parte do IFN $\gamma$  para o combate nesses cenários, e os linfócitos auxiliares T CD4<sup>+</sup> são importantes para auxiliar as células citadas anteriormente e controlar a homeostasia e inflamação (WANG *et al.*, 2004; SANA *et al.*, 2022).

Citocinas como MIF e a IL-6 demonstram uma importante atuação no combate frente a *T. gondii*. A citocina MIF (fator de inibição de migração de macrófagos), em altas concentrações, é capaz de reduzir a transmissão vertical do parasito, tendo em vista que no primeiro trimestre da gestação está presente em doses elevadas, enquanto no terceiro trimestre está em doses reduzidas, e isso relacionado com o fato de que quanto maior o tempo de gestação, maiores as chances da transmissão acontecer (DE OLIVEIRA GOMES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2014).

Entretanto, a IL-6 também é de suma importância tanto no controle da proliferação do parasito, quanto no sucesso da gestação. Ela é uma importante citocina no início da gestação, no processo de implantação e nos seus estágios iniciais (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Como já foi visto, camundongos nocaute para essa citocina demonstraram uma susceptibilidade mais

elevada frente uma infecção com o *Toxoplasma gondii*, além de uma possível resposta imune descontrolada e letal para os animais, demonstrando sua importância tanto na defesa quanto na regulação da resposta imune (JEBBARI et al., 1998).

Em contrapartida a esse perfil Th1 assumido frente a infecção, durante a gravidez, um perfil de resposta Th2 é preferível, e as células da interface placentária, as células trofoblásticas, são importantes devido a produção de citocinas com perfil anti-inflamatório, como as IL-4, IL-5 e IL-10, além de fatores de crescimento transformador (TGF- $\beta$ 1). Todas essas auxiliam no processo normal e sucesso da gestação, como a adesão do blastocisto, invasão e implantação do endométrio e a diferenciação celular (RAGHUPATHY, 2001; OLIVEIRA et al., 2021).

Essa relação de perfil de resposta imune preferível para a gestação e perfil de resposta frente ao parasito é de suma importância, pois as citocinas produzidas por esses perfis atuam modificando a atuação de certas células no progresso saudável da gravidez, por exemplo, as células NK, quando em contato com essas proteínas atuam de formas diferentes, sendo uma célula de extrema importância para esse percurso correto da gestação.(KING et al., 1997; JABRANE-FERRAT, 2019; ZHANG; WEI, 2021).

### 1.3. Tratamentos alternativos e RVIs

O tratamento convencional para a toxoplasmose é dado pela associação de dois fármacos, a sulfadiazina (SDZ) e pirimetamina (PYR), onde ambos vão atuar em sinergia inibindo a síntese de pirimidinas em *T. gondii*, as quais são utilizadas para sua sobrevivência e replicação. Esse é o principal tratamento recomendado para mulheres grávidas. Porém, essa associação apresenta alguns efeitos colaterais, como supressão da medula óssea, deficiência de ácido fólico, toxicidade hematológica e hipersensitividade, que podem levar a interrupção do tratamento, além de poder causar efeitos teratogênicos no feto (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; JAFARPOUR AZAMI et al., 2021). Nesse cenário, é relevante considerar compostos alternativos para o tratamento da toxoplasmose congênita.

Alguns estudos já avaliam compostos naturais para serem utilizados nas células placentárias, a fim de substituir esses medicamentos que possuem efeitos colaterais e causam a interrupção da medicalização. Como exemplo, um estudo que avaliou a atuação de óleos essenciais extraídas da *Copaifera* sp, uma árvore presente nas Américas e na África, contra o *T. gondii*, demonstrando que esses compostos reduziram o parasitismo nas células trofoblásticas (TEIXEIRA et al., 2020). Assim como a enrofloxacin, um antibiótico e o toltrazuril, um coccidicida que também demonstraram efeitos anti *T. gondii* nos trofoblastos (DA SILVA, Rafaela J. et al., 2017).

Além dos compostos naturais, existem os compostos sintéticos, que utilizam como base outras fórmulas químicas as quais já demonstraram uma atividade antiparasitária, como em estudos os quais demonstraram que a 4-tiazolidina e seus derivados, que contém bases sulfonadas e nitrogenadas, possuem atividade anti-*T. gondii*, e em alguns casos, obtiveram resultados melhores do que os tratamentos clássicos para toxoplasmose (TENÓRIO *et al.*, 2005; MOLINA *et al.*, 2021).

Tendo em vista que esses compostos podem ser alternativas para o tratamento convencional da toxoplasmose e da toxoplasmose congênita, foram desenvolvidos pelo Instituto de Química da UFU dois compostos sintéticos, o RVI 30 e o RVI 33, que são similares aos citados acima, incluindo as bases nitrogenadas e sulfonadas, para serem testados frente a infecção *in vitro* de *T. gondii* em células trofoblásticas BeWo.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando que a forma congênita da toxoplasmose é um grave problema de saúde pública no Brasil e em outras regiões do mundo, torna-se extremamente necessário investigar o papel de novas formas terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos colaterais para a infecção congênita por *T. gondii*.

Ainda não há dados na literatura científica sobre as funções destes compostos nas funções antiparasitárias em células trofoblásticas. Os resultados obtidos com este projeto poderão propiciar conhecimentos essenciais na elaboração de futuras formas terapêuticas contra *T. gondii* na gestação, reduzindo significativamente as taxas de toxoplasmose congênita e impactando consideravelmente na qualidade de vida das crianças infectadas congenitamente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

Avaliar a influência terapêutica dos RVI 30 e RVI 33 em células trofoblásticas BeWo infectadas por *T. gondii*.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade celular em células BeWo tratadas com diferentes concentrações dos RVIs;
- Avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo tratadas ou não com concentrações não tóxicas dos RVIs;
- Avaliar a invasão de taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados com os RVIs nas células BeWo;
- Avaliar o possível efeito irreversível dos RVIs na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1. Cultura das células BeWo

Células trofoblásticas vilosas humanas (BeWo) foram mantidas em frascos de cultura em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 100 U/mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 10% de soro bovino fetal (FBS) (Cultilab) em uma incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil, comunica que estudos realizados com linhagens celulares adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética por este comitê (Protocolo nº 13/2012).

### 4.2. Manutenção dos parasitos

Os taquizoítos de *T. gondii* utilizados foram do clone 2F1, derivados da cepa RH altamente virulenta e expressando o gene da β-galactosidase, que foram cedidos pelo Dr. Vernon Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan (EUA). O parasita foi mantido em frascos de cultura contendo células BeWo em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de FBS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.3 Diluição dos compostos

Ambos os compostos, RVI30 e RVI33, foram cedidos gentilmente pela Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Os mesmos foram diluídos em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,8% para a realização dos ensaios. Por questões de proteção (sigilo) de dados, as fórmulas químicas não puderam ser disponibilizadas neste presente trabalho, pois estão em processo de apresentação científica em periódico internacional. Após essa divulgação primária na literatura, será possível divulgar as fórmulas químicas destes compostos no artigo científico oriundo deste trabalho.

### 4.4. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio colorimétrico de sal de tetrazólio (MTT) foi realizado na célula BeWo. Para este fim, as células foram adicionadas em placas de cultura contendo 96 poços (3x10<sup>4</sup>/200µL/poço) em meio RPMI 1640 com 10% de SFB a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 12 horas. As células foram tratadas nas concentrações de 200µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,250 µM, 3,125 µM, 1,56 µM e 0,78 µM, tanto para RVI30 quanto para RVI33, após 24 h de tratamento, tiveram os sobrenadantes removidos e as células incubadas com 10 µL de MTT (5

mg/mL) mais 90  $\mu$ L de meio com 10% SBF por 4 h nas mesmas condições da cultura. A solubilização dos cristais de formazan ocorreu através da adição de uma solução contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) e 50% N,N-dimetilformamida (Sigma) por 30 min. E por fim foram mensuradas as densidades ópticas a 570 nm em um leitor de placa (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Mclean, VA, EUA). Os dados foram expressos pela porcentagem de células viáveis em comparação com as células não tratadas (100% de viabilidade).

#### **4.5. Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii***

As células BeWo foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços ( $3 \times 10^4/200$   $\mu$ L/poço) em meio RPMI 1640 com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1) na proporção de 3 parasitos por célula (3:1) por 3 h para permitir a infecção adequada das células. Em seguida, os poços passaram por uma lavagem para retirada de parasitos extracelulares e as células tratadas com as concentrações pré-definidas não tóxicas dos RVIs, por adicionais 24 h. Associação de sulfadiazina e pirimetamina (200 $\mu$ g/ml SDZ + 8 $\mu$ g/ml PYR) foi usada como controle positivo. Paralelamente, as células foram processadas para o ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* pela reação colorimétrica de  $\beta$ -galactosidase, conforme os estudos prévios do grupo (BUCKNER *et al.*, 1996; FONSECA-BERZAL *et al.*, 2018).

#### **4.6. Ensaio de invasão parasitária**

Células BeWo foram adicionadas em placas de 96 poços ( $3 \times 10^4/200$   $\mu$ L/poço) em meio RPMI 1640 com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e infectadas após 24 h com taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1) previamente tratados por 1 h com os RVIs, na proporção de 3 parasitos por célula (3:1), seguido de incubação por 3 h para permitir a infecção adequada das mesmas. Associação de sulfadiazina e pirimetamina foi usada como controle positivo. Após isso, os poços foram lavados para retirada de parasitos extracelulares e as células processadas para o ensaio de invasão de *T. gondii* pela reação colorimétrica de  $\beta$ -galactosidase, conforme estudos prévios do nosso grupo (BUCKNER *et al.*, 1996; FONSECA-BERZAL *et al.*, 2018).

#### **4.7. Ensaio de reversibilidade**

As células BeWo foram adicionadas em placas separadas de 96 poços ( $3 \times 10^4/200$   $\mu$ L/poço) em meio RPMI 1640 com 10% de FBS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1) na proporção de 3 parasitos por célula

(3:1), seguido de incubação por 3 h para permitir a infecção adequada das mesmas. Em seguida, os poços foram lavados para retirada de parasitos extracelulares e as células tratadas com os RVIs, em diferentes concentrações, por adicionais 24 h. A associação de sulfadiazina e pirimetamina foi usada como controle positivo. Após 24 h de infecção e tratamento, o sobrenadante contendo tratamento dos poços de uma das placas foi retirado, os poços lavados com PBS e adicionado novo meio RPMI 1640 livre de tratamento e incubado por mais 24 h. Paralelamente, na outra placa, o sobrenadante com tratamento foi retirado e realizou-se o ensaio colorimétrico de beta-galactosidase com 24h de infecção. Após este período, o ensaio de  $\beta$ -galactosidase foi realizado conforme descrito anteriormente e a avaliação de possível reversibilidade realizada (BUCKNER *et al.*, 1996; FONSECA-BERZAL *et al.*, 2018).

#### **4.8. Análise estatística**

Os dados foram analisados com média e erro padrão usando o programa *GraphPad Prisma* versão 8.0 (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, EUA) de três experimentos independentes realizados em oito replicatas. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni em casos de testes paramétricos; casos não pareados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns; e as comparações entre as condições pares realizadas pelo teste *t de Student*. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Toxicidade dos RVIs

Primeiro buscamos avaliar quais concentrações dos compostos RVI30 e RVI33 seriam tóxicos para as células BeWo. Para isso o teste de viabilidade celular (MTT) foi realizado na placa de 96 poços nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, e 0,78  $\mu\text{M}$ , bem como controle em DMSO (0,8%), e outra apenas com meio de cultura com a finalidade de avaliar quais concentrações seriam viáveis para o tratamento das células.

A redução de viabilidade celular foi observada nas células tratadas com o RVI30 nas concentrações de 200, 100 e 50 $\mu\text{M}$  ( $P < 0,05$ ) em comparação com células não tratadas (meio) ou tratadas com DMSO a 0,8% (**Fig. 1A**). Por outro lado, o tratamento de células com o RVI33 ocasionou redução da viabilidade celular a partir da concentração de 25 $\mu\text{M}$  ( $P < 0,05$ ) em comparação com células não tratadas (meio) ou tratadas com DMSO a 0,8% (**Fig. 1B**). Por fim, as células tratadas com DMSO não mostraram qualquer alteração na viabilidade celular em relação às células não tratadas.

### 5.2 Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* nas células BeWo

Ao analisar os efeitos do RVI 30 sobre as células BeWo, todas as concentrações escolhidas foram capazes de diminuir o parasitismo nessas células em relação a células não tratadas ( $P < 0,05$ ). Em adição, foi possível observar que a concentração de 25 $\mu\text{M}$  foi mais eficaz em reduzir o parasitismo quando comparado com o tratamento convencional (SDZ+PYR) ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 2A**). Quanto ao RVI 33, todas as concentrações foram capazes de reduzir a proliferação do parasito em comparação às células não tratadas (**Fig. 2B**).

### 5.3 Ensaio de invasão por *T. gondii*

Os resultados observados ao tratar os taquizoítos com o RVI 30 ou 33 nas células BeWo foram de que as dosagens de 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$  reduziram, significativamente, a invasão do parasito quando comparado com células não infectadas e com associação de pirimetamina e sulfadiazina ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 3A e B**).

### 5.4 Ensaio de reversibilidade parasitária

De acordo com nossos resultados anteriores, as concentrações de 6,25 e 12,5 foram as concentrações que melhor controlaram o parasitismo e não foram tóxicas para a célula após 24 h de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). Curiosamente a

concentração de 12,5 $\mu$ M de ambos compostos foi capaz de manter níveis baixos do parasitismo mesmo após a remoção do tratamento ( $P < 0.05$ ). Porém, a concentração de 6,25 $\mu$ M de ambos RVIs não manteve níveis baixos de taquizoítos de *T.gondii* (**Figura 4A,B**).

## 6 DISCUSSÃO

Destaca a importância de se estudar novas formas de tratamento para a toxoplasmose congênita devido a sua capacidade de infectar o feto e alterar o seu curso normal de desenvolvimento, levando a má formações e até mesmo ao aborto, além de efeitos colaterais que levam ao abandono do tratamento (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A partir desses dados, vários estudos tem sido feitos utilizando compostos naturais e compostos sintéticos para avaliar sua atividade frente ao *T. gondii*, como a óleo resina de *Copaifera sp*, composto natural que demonstrou efeitos anti-*T. gondii* promissores (TEIXEIRA et al., 2020), e os estudos envolvendo derivados das 4-tiazolidinas, compostos sintéticos os quais também demonstraram atividade antiparasitária (TENÓRIO et al., 2005; MOLINA et al., 2021). Tendo em vista isso, os compostos produzidos pelo Laboratório de Compostos Bioativos, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) foram testados no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução do Instituto de Ciências Biomédicas, também da UFU para avaliar seu potencial anti-*T. gondii*.

Os dois compostos, RVI 30 e 33 tem efeitos na linhagem celular BeWo esses efeitos são vistos primeiramente nos testes de viabilidade celular, demonstrando que as concentrações de 50, 100 e 200  $\mu$ M foram tóxicas. a viabilidade começou a diminuir a partir de 25  $\mu$ M, mas a viabilidade reduzida não foi considerada tóxica.

Esses dados de alteração na fisiologia das células é confirmado pelos testes de proliferação intracelular de *T. gondii*, onde os compostos demonstraram uma atividade supressora na proliferação parasitária em células previamente infectadas. Ressaltando que o RVI 30 além de ter reduzido a proliferação em relação ao tratamento padrão (SDZ+PYR), apresentou um efeito antiparasitário superior ao tratamento concencional quando aplicado a 25 $\mu$ M. O RVI 33 também teve um efeito antiparasitário, mas não foi mais eficiente se comparado ao tratamento clássico (SDZ+PYR). Com os resultados dos testes de invasão parasitária, é possível inferir também que os compostos apresentaram alguma atividade sobre os parasitos diretamente, tendo em vista que após tratá-los com ambos RVIs, na linhagem BeWo sua invasão celular foi diminuída, mais do que o tratamento convencional, nas dosagens

de 6,25 e 12,5  $\mu$ M. Por fim, é sabido que a associação convencional SDZ+PYR é capaz de reduzir irreversivelmente a proliferação intracelular do parasito, e nossos experimentos sugerem que o tratamento com doses mais altas do composto foi mais eficaz do que quando tratamos com concentrações muito baixas, de modo que permite a irreversibilidade do fenômeno de controle parasitário, como foi visto que ambos RVIs nas células também apresentaram o mesmo efeito irreversível quando aplicados a 12,5  $\mu$ M.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram outras formas alternativas para redução da infecção placentária por *T. gondii*, quando verificamos que óleorresinas de diversas espécies de *Copaifera* reduziram a infecção em células BeWo, HTR8/SVneo e vilos placentários humanos de terceiro trimestre (DA SILVA *et al.*, 2017; MARTINEZ *et al.*, 2023). Em adição, também concluímos em estudos prévios que compostos capazes de inibir a ciclooxigenase 2 (COX2) também foram capazes de controlar a infecção por *T. gondii* em células BeWo, HTR8/SVneo e vilos placentários humanos a termo (DE SOUZA *et al.*, 2021).

Portanto, nosso grupo de pesquisa tem experiência em testes de novos possíveis fármacos contra infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal humana. Os compostos, geralmente, modulam a resposta imune da célula hospedeira e podem causar alguma alteração ultra-estrutural no parasito e/ou na própria célula hospedeira. Teixeira *et al* (2020) e Da Silva *et al* (2017) verificaram que óleorresinas de *Copaifera* e enrofloxacinina induziram prejuízo na citocinese de *T. gondii*, bem como alteração na dupla membrana do taquizoíto. É possível especular que ambos RVI30 e RVI33 possam induzir as mesmas alterações ultra-estruturais, pois quando taquizoitos foram pré-tratados por 1h com os compostos, houve redução da invasão nas células BeWo.

Para avaliar de fato como os compostos atuam tanto nas células quanto nos parasitos, serão necessários outros testes como os de microscopia eletrônica e dosagem de citocinas.

## 7 CONCLUSÃO

Após os testes realizados, foi demonstrado que os compostos mostraram atividade antiparasitária, sendo capaz de diminuir a proliferação e invasão nas células BeWo. Como visto nos experimentos nas células BeWo, os compostos foram capazes de reduzir a proliferação do *T. gondii* de forma irreversível e superior a associação de sulfadiazina e pirimetamina (SDZ+PYR), não permitindo que após a retirada do tratamento, o parasito volte a proliferar.

Tendo em vista os resultados analisados, os compostos se mostraram boas alternativas a associação de sulfadiazina e pirimetamina contra as infecções de *T. gondii* nas células placentárias. Apesar disso, ainda é necessário realizar dosagens de citocinas como sobrenadantes coletados para avaliar o perfil de resposta imune das células frente aos parasitos após os tratamentos. Uma avaliação de topografia celular e do parasito também se vê necessária, assim como a avaliação do metabolismo celular frente os compostos. Por fim, testes *ex vivo* com vilos placentários humanos e *in vivo* em modelos animais murinos, são necessários a fim de comprovar a eficácia dos compostos no tratamento da toxoplasmose congênita.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, B. F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, vol. 35, no. 3, p. 152–162, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.013>.
- BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 40, no. 11, p. 2592–2597, Nov. 1996. <https://doi.org/10.1128/aac.40.11.2592>.
- DA SILVA, R. J.; GOMES, A. O.; FRANCO, P. S.; PEREIRA, A. S.; MILIAN, I. C. B.; RIBEIRO, M.; FIORENZANI, P.; DOS SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; DA SILVA, N. M.; FERRO, E. A. V.; DE FREITAS BARBOSA, B. Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma Gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from Human Third Trimester Pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 7, 26 Jul. 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00340>.
- DE OLIVEIRA GOMES, A.; DE OLIVEIRA SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; DE FREITAS BARBOSA, B.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BECHI, N.; PAULESU, L. R.; DOS SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Placental Explants Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on Gestational Age. **The American Journal of Pathology**, vol. 178, no. 6, p. 2792–2801, Jun. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>.
- DE SOUZA, G.; SILVA, R. J.; MILIÁN, I. C. B.; ROSINI, A. M.; DE ARAÚJO, T. E.; TEIXEIRA, S. C.; OLIVEIRA, M. C.; FRANCO, P. S.; DA SILVA, C. V.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M.; FERRO, E. A. V.; BARBOSA, B. F. Cyclooxygenase (COX)-2 Modulates *Toxoplasma Gondii* infection, Immune Response and Lipid Droplets Formation in Human Trophoblast Cells and Villous Explants. **Scientific Reports**, vol. 11, no. 1, 16 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92120-3>.
- DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in Humans and Animals in Brazil: High prevalence, High Burden of disease, and



Epidemiology†. **Parasitology**, vol. 139, no. 11, p. 1375–1424, 1 Sep. 2012. DOI 10.1017/S0031182012000765. Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/toxoplasmosis-in-humans-and-animals-in-brazil-high-prevalence-high-burden-of-disease-and-epidemiology/CD91DD8A60F76A2E4D02752FD6D49802#>.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 11, no. 2, p. 267–299, 1 Apr. 1998. DOI 10.1128/cmr.11.2.267. Disponível em: <https://cmr.asm.org/content/11/2/267>.

DUBEY, J. P.; MURATA, F. H. A.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; KWOK, O. C. H.; VILLENA, I. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. **Parasitology**, vol. 148, no. 12, p. 1406–1416, 18 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1017/s0031182021001013>.

EL BISSATI, K.; LEVIGNE, P.; LYKINS, J.; ADLAOUI, E. B.; BARKAT, A.; BERRAHO, A.; LABOUDI, M.; EL MANSOURI, B.; IBRAHIMI, A.; RHAJAOUI, M.; QUINN, F.; MURUGESAN, M.; SEGHROUCHNI, F.; GÓMEZ-MARÍN, J. E.; PEYRON, F.; MCLEOD, R. Global initiative for congenital toxoplasmosis: an observational and international comparative clinical analysis. **Emerging Microbes & Infections**, vol. 7, no. 1, p. 1–14, 27 Set. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0164-4>.

FISCH, D.; CLOUGH, B.; FRICKEL, E.-M. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. **PLOS Pathogens**, vol. 15, no. 12, p. e1008097, 12 Dez. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008097>.

FONSECA-BERZAL, C.; ARÁN, V. J.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, vol. 117, no. 11, p. 3367–3380, 19 Set. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6084-3>.

GRANT, Alyce. Varicella Infection and Toxoplasmosis in Pregnancy. **The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 17–29, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1097/00005237-199609000-00003>.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 172, no. 6, p. 1561–1566, 1 Dez. 1995. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>.

JABRANE-FERRAT, N. Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. **Frontiers in Immunology**, vol. 10, 28 Jun. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01397>.

JAFARPOUR AZAMI, S.; MOHAMMAD RAHIMI, H.; MIRJALALI, H.; ZALI, M. R. Unravelling *Toxoplasma* treatment: Conventional Drugs toward Nanomedicine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 37, no. 3, 10 Fev. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03000-x>.

JEBBARI, H.; ROBERTS, C. W.; FERGUSON, D. J.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, vol. 20, no. 5, p. 231–239, Mai 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x>.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International journal for parasitology**, vol. 34, no. 3, p. 423–432, 9 Mar. 2004. DOI 10.1016/j.ijpara.2003.12.009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086386/>.

KING, A.; HIBY, S. E.; VERMA, S.; BURROWS, T.; GARDNER, L.; LOKE, Y. W. Uterine NK Cells and Trophoblast HLA Class I Molecules. **American Journal of Reproductive Immunology**, vol. 37, no. 6, p. 459–462, Jun. 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1997.tb00260.x>.

KOCHANOWSKY, J. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*. **Current Biology**, vol. 28, no. 14, p. R770–R771, 23 Jul. 2018. DOI 10.1016/j.cub.2018.05.035. Disponível em: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(18\)30671-7?](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(18)30671-7?)

MAREZE, M.; BENITEZ, A. do N.; BRANDÃO, A. P. D.; PINTO-FERREIRA, F.; MIURA, A. C.; MARTINS, F. D. C.; CALDART, E. T.; BIONDO, A. W.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. **PLOS ONE**, vol. 14, no. 2, p. e0212375, 14 Fev. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212375>.

MARTÍNEZ, A. F. F.; TEIXEIRA, S. C.; DE SOUZA, G.; ROSINI, A. M.; JÚNIOR, J. P. de L.; MELO, G. N.; BLANDÓN, K. O. E.; GOMES, A. O.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G.; FERRO, E. A. V.; BARBOSA, B. F. Leaf

hydroalcoholic extract and oleoresin from *Copaifera multijuga* control *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and placental explants from third-trimester pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 13, 13 Feb. 2023. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1113896>. Accessed on: 11 Abr. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Doenças tropicais negligenciadas**. Brasília: MINISTÉRIO DA SAÚDE, mar. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tracoma/publicacoes/boletim-epidemiologico-doencas-tropicais-negligenciadas>>.

MOLINA, D. A.; RAMOS, G. A.; ZAMORA-VÉLEZ, A.; GALLEGU-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*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, vol. 16, p. 129–139, Ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.05.004>.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet (London, England)**, England, vol. 363, no. 9425, p. 1965–76, 2004. DOI [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194258>.

OLIVEIRA, F. C.; SILVA, R. J.; RIBEIRO, M.; GUIRELLI, P. M.; CASTRO, A. S.; GOMES, A. O.; FRANCO, P. S.; TEIXEIRA, S. C.; MINEO, J. R.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A. V. ERK1/2 phosphorylation and IL-6 production are involved in the differential susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in three types of human (cyto/ syncytio/ extravillous) trophoblast cells. **Tissue and Cell**, vol. 72, p. 101544, Out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101544>.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, vol. 38, no. 5, p. 561–569, Abr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, vol. 13, no. 4, p. 219–227, Ago. 2001. <https://doi.org/10.1006/smim.2001.0316>.

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. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, vol. 36, p. 039463202210784, Jan. 2022. <https://doi.org/10.1177/03946320221078436>.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. The Fine Structure and Reproduction of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, vol. 54, no. 2, p. 209, Abr. 1968.

<https://doi.org/10.2307/3276925>.

TEIXEIRA, S. C.; DE SOUZA, G.; BORGES, B. C.; DE ARAÚJO, T. E.; ROSINI, A. M.; AGUILA, F. A.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. J. B.; MARTINS, C. H. G.; DE FREITAS BARBOSA, B.; FERRO, E. A. V. Copaifera spp. Oleoresins Impair *Toxoplasma Gondii* Infection in Both Human Trophoblastic Cells and Human Placental Explants. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 15158, 16 Set. 2020. DOI 10.1038/s41598-020-72230-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-72230-0>.

TENÓRIO, R. P.; CARVALHO, C. S.; PESSANHA, C. S.; DE LIMA, J. G.; DE FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; DE MELO, E. J. T.; GÓES, A. J. S. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 15, no. 10, p. 2575–2578, Mai. 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.048>.

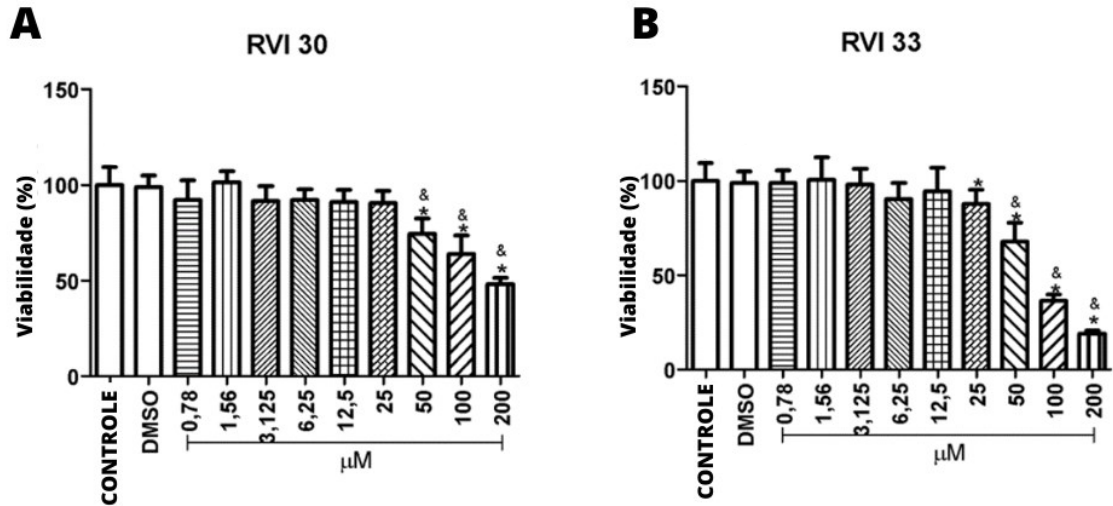
TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, vol. 91, no. 7, p. 501–508, 3 Mai. 2013. <https://doi.org/10.2471/blt.12.111732>.

XIAO, Z.; YAN, L.; LIANG, X.; WANG, H. Progress in Deciphering Trophoblast Cell Differentiation during Human Placentation. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 67, p. 86–91, 1 Dez. 2020. DOI 10.1016/j.ceb.2020.08.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067420301071?via%3Dihub>.

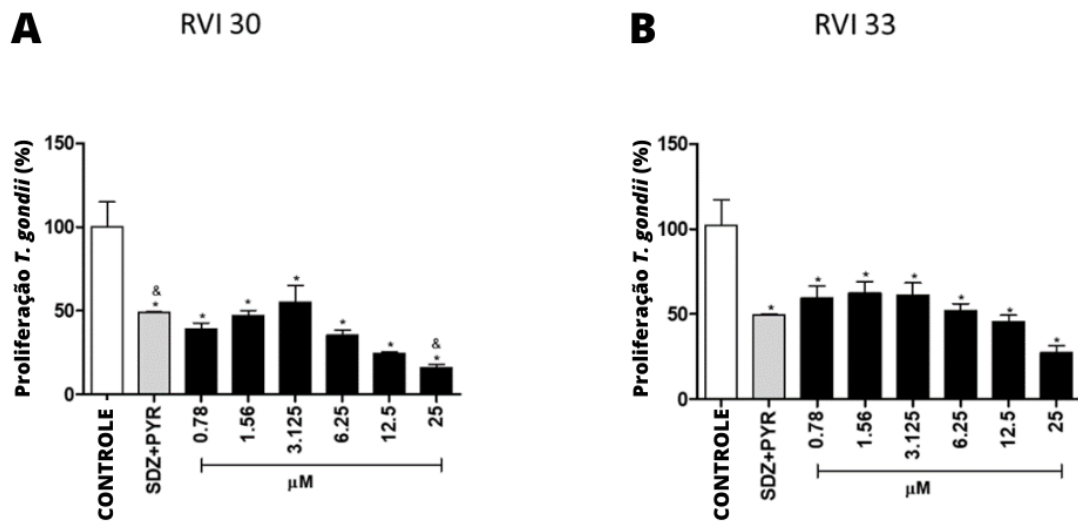
ZHANG, X.; WEI, H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, p. 728291, 26 Ago. 2021. DOI 10.3389/fimmu.2021.728291. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8426434/>.

WANG, X.; KANG, 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**, vol. 72, no. 8, p. 4432–4438, Ago. 2004. <https://doi.org/10.1128/iai.72.8.4432-4438.2004>.

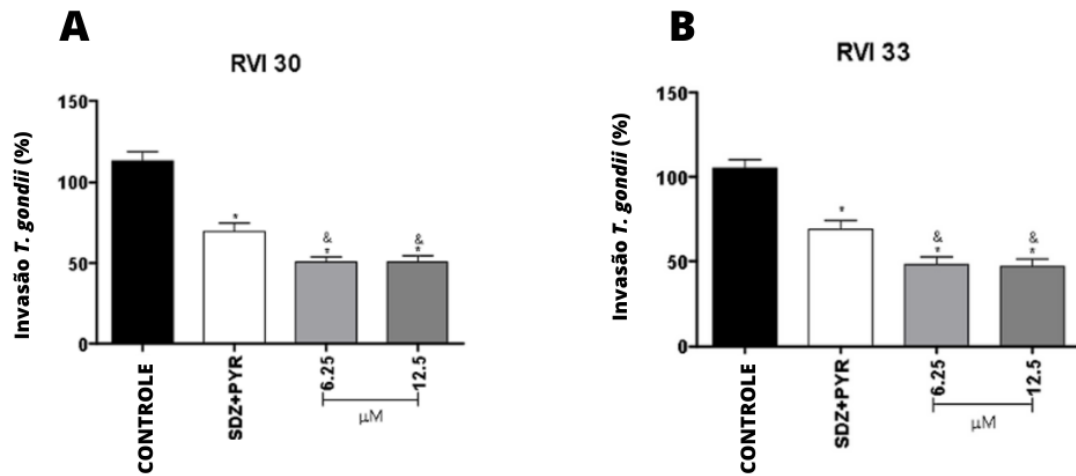
## FIGURAS



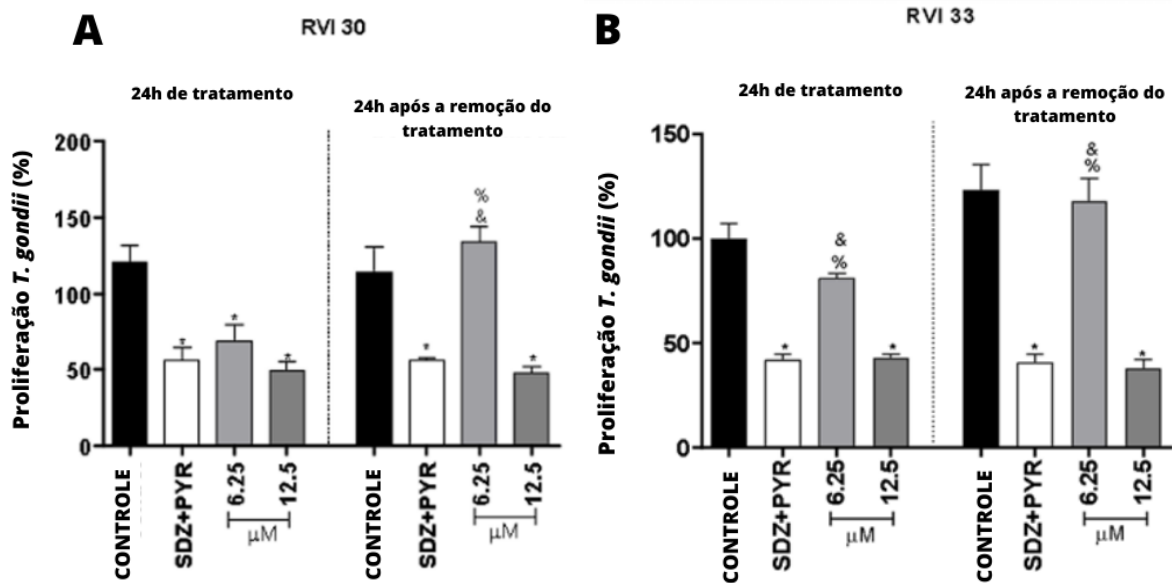
**Figura 1 (A e B):** Ensaio de viabilidade celular. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h, tratadas ou não com concentrações crescentes dos compostos RVI30 (A) ou RVI33 (B) por adicionais 24 h, e submetidas ao ensaio de viabilidade celular pelo MTT. Como controle, células foram tratadas com DMSO a 0,8% ou apenas meio de cultura (controle). Diferenças estatísticas em relação ao controle (\*) ou a DMSO (&). Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e pós-teste de Dunns. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .



**Figura 2 (A e B):** Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii*. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h, infectadas na proporção 3:1 com taquizoítos de *T. gondii* por 3 h, posteriormente tratadas ou não com concentrações crescentes não tóxicas dos compostos RVI30 (A) ou RVI33 (B) por adicionais 24 h, e submetidas ao ensaio colorimétrico de beta-galactosidase para quantificação da carga parasitária. Como controle positivo, combinação de sulfadiazina mais pirimetamina (SDZ+PYR) foi utilizada e, como controle negativo, apenas meio de cultura foi adicionado (controle). Diferenças estatísticas em relação ao controle (\*) ou a SDZ+PYR (&). Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e pós-teste de Dunns. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .



**Figura 3 (A e B):** Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii*. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h, infectadas na proporção 3:1 com taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados por 1 h com RVI30 (A) ou RVI33 (B) durante 3 h, e submetidas ao ensaio colorimétrico de beta-galactosidase para quantificação da carga parasitária. Como controle positivo, combinação de sulfadiazina mais pirimetamina (SDZ+PYR) foi utilizada e, como controle negativo, apenas meio de cultura foi adicionado (controle). Diferenças estatísticas em relação ao controle (\*) ou a SDZ+PYR (&). Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e pós-teste de Dunns. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .



**Figura 4 (A e B):** Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii*. Células BeWo foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h, infectadas na proporção 3:1 com taquizoítos de *T. gondii* por 3 h, posteriormente tratadas ou não com concentrações crescentes não tóxicas dos compostos RVI30 (A) ou RVI33 (B) por adicionais 24 h, e submetidas a dois procedimentos diferentes: numa das placas, o meio com tratamento foi retirado e substituído por meio de cultura livre de tratamento por adicionais 24 h; e na outra placa o meio foi retirado, permanecendo 24 h de tratamento e as células processadas para análise da carga parasitária. Como controle positivo, combinação de sulfadiazina mais pirimetamina (SDZ+PYR) foi utilizada e, como controle negativo, apenas meio de cultura foi adicionado (controle). Diferenças estatísticas em relação ao controle (\*) ou a SDZ+PYR (&). Diferença estatística entre as dosagens de 6,25 e 12,5 (%). Diferenças significativas foram determinadas pelo One-way ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e pós-teste de Dunns. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .