

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**Potencial ação anti-*Toxoplasma gondii* de dois
novos compostos químicos sintéticos em modelos
de interface materno-fetal humana**

Alessandra Monteiro Rosini

Uberlândia

Abril - 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial a obtenção do título
de Doutor

Aluna: Alessandra Monteiro Rosini

Orientador: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Co-orientador: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Uberlândia

Abril - 2024

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

R821
2024

Rosini, Alessandra Monteiro, 1994-
Potencial ação anti-Toxoplasma gondii de dois novos
produtos sintéticos em modelos de interface materno-
fetal humana [recurso eletrônico] / Alessandra Monteiro
Rosini. - 2024.

Orientador: Bellisa de Freitas Barbosa.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.350>
Inclui bibliografia.

1. Imunologia. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III.
Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 163				
Data:	26/04/2024	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	11 h20 min
Matrícula do Discente:	11923IPA001				
Nome do Discente:	Alessandra Monteiro Rosini				
Título do Trabalho:	Potencial ação anti-Toxoplasma gondii de dois novos compostos químicos sintéticos (RVI 30 e RVI 33) em modelos de interface materno-fetal humana				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização do Comportamento das Células Trofoblásticas Frente a Transmissão Congênita de Toxoplasma gondii				

Em 26 de abril de 2024, às 08:00 horas, no Anfiteatro do Bloco 4K - UFU - Umuarama, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos membros titulares: Presidente: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - UFU / ICBIM / PPGIPA, orientadora da candidata; Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes - UFTM; Prof. Dr. Rafael de Oliveira Resende - FIOCRUZ - RJ / UFU; Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga - UFU / DEPAR; Dra. Flávia Batista Ferreira - (pós-doc) - UFU.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, apresentou a Comissão Examinadora e a candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação, o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADA

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/04/2024, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Tomaz Gonzaga, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/04/2024, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Batista Ferreira França, Usuário Externo**, em 26/04/2024, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael de Oliveira Resende, Tecnologista em Saúde**, em 26/04/2024, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 26/04/2024, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5365320** e o código CRC **1F198E59**.

AGRADECIMENTOS

Neste momento de profunda gratidão, não posso deixar de elevar meus pensamentos primeiro a Deus, cuja orientação e graça têm sido a luz que ilumina meu caminho em todas as estações da vida. A Ele, que nunca me abandonou, dedico minha mais sincera gratidão.

À minha mãe Elizabeth, um oceano de amor e sacrifício, minha eterna fonte de inspiração e força. Sem sua orientação amorosa, eu não estaria aqui, celebrando estas conquistas. Teu amor moldou o que sou hoje, e cada passo que dou é em homenagem ao teu apoio incansável.

Ao meu pai Fred e à minha irmã Andressa, pilares inabaláveis em minha jornada, agradeço por cada palavra de encorajamento, por estarem ao meu lado em todas as horas. Vocês são minha âncora e minha fortaleza.

A Prof^a Dr^a Bellisa de Freitas Barbosa, minha orientadora, é mais que uma mentora; ela é uma inspiração, que me conduziu com sabedoria e paciência por este caminho acadêmico. Sua dedicação e compromisso são admiráveis, e sou profundamente grata por sua orientação.

À professora Dr^a Eloisa e aos membros do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, em especial Samuel, Marina e Luana, devo minha admiração e respeito. Cada um de vocês contribuiu para enriquecer minha jornada acadêmica, compartilhando conhecimento e amizade.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão pelo generoso gesto de compartilhar os compostos RVI30 e RVI33 a professora Dr^a Amanda Danuello e sei estimado aluno Raul. Sua contribuição não apenas enriquece nosso trabalho, mas também fortalece nossa comunidade acadêmica, promovendo a colaboração e o avanço mútuo do conhecimento.

Aos amigos do laboratório de alergia do professor Ernesto Taketomi, agradeço pela amizade e pelo apoio mútuo, em especial, Alessandro e Laura. Juntos, enfrentamos desafios e celebramos vitórias, formando laços que são verdadeiros tesouros em minha vida.

Ao Thales, meu companheiro, agradeço por ser meu porto seguro em meio às tempestades. Com você ao meu lado, sei que posso conquistar qualquer desafio que a vida apresentar.

Por fim, quero dizer que, embora possamos não estar exatamente onde esperávamos, cada passo dado nos aproxima de nossos sonhos. Nos momentos de incerteza, lembremo-nos de que somos capazes de superar qualquer obstáculo. Com amor, dedicação e perseverança, alcançaremos nossos objetivos e metas, porque dentro de nós reside uma força inabalável que nos impulsiona para frente. Que este momento de gratidão seja apenas o começo de uma jornada repleta de realizações e felicidade.

Com todo o meu amor e gratidão,

Alessandra Rosini

23:1-6 : “O senhor é meu pastor, nada me faltará.”

LISTA DE ABREVIACÕES

CPRG- Chlorophenol Red- β -D-galactopyranoside

ELISA- Ensaio de Imunoabsorção Enzimático

FBS- Soro Fetal Bovino

hCG- Gonadotrofina Coriônica Humana

HC-UFU- Hospital das Clínicas Da Universidade Federal de Uberlândia

IFN- γ - Interferon γ

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

IL-6- Interleucina-6

IL-8- Interleucina-8

IRF3- Fator Regulador do Interferon do tipo 3

LPS- Lipopolissacarídeo

MAPK- Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MgCl₂- Cloreto de Magnésio

MICs- Micronemas

MIF- Fator Inibitório de Migração dos Macrófagos

MYDD88- Fator 88 de Diferenciação Mielóide

NF- κ b- Fator Nuclear kappa b

NK-Natural Killer

NOD- Receptores Similares ao Domínio de Oligomerização Ligante de Nucleotídeo

PAMPs- Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS- Tampão Fosfato Salino

PETN-MG- Programa Estadual de Triagem Neonatal

PLAP- Fosfatase Alcalina Placentária

PRR- Receptores de Reconhecimento Padrão

RNAs- Ácido Ribonucleico

ROMs- Proteases Romboides

ROPs- Roptrias

TGF- β 1- Fator de transformação do crescimento beta 1

TH1- T helper 1

TH2- T helper 2

TLR- Toll-like receptor

TLR2- Toll-like Receptor 2

TLR4- Toll-like Receptor 4

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRIF- Proteína adaptadora contendo o domínio TIR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura representativa das células placentárias.

Figura 2. Estrutura molecular de RVI 30 e RVI 33.

Figura 3. RVI 30 e RVI 33 reduziram a viabilidade das células BeWo apenas em altas concentrações.

Figura 4. RVI 30 e RVI 33 foram capazes de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo.

Figura 5. RVI 30 e RVI 33 demonstraram um efeito anti-*T. gondii* irreversível de maneira dependente da dose.

Figura 6. RVI 30 e RVI 33 apresentaram uma ação direta sobre taquizoítos de *T. gondii*.

Figura 7. Células BeWo tratadas com RVI 30 ou RVI 33 demonstraram redução na invasão de *T. gondii*.

Figura 8. Células BeWo infectadas com *T. gondii* e tratadas com RVI 30 apresentaram aumento de MIF e modulação negativa de IL-8.

Figura 9. Células BeWo infectadas com *T. gondii* e tratadas com RVI 33 apresentaram aumento de MIF.

Figura 10. RVI 30 e RVI 33 não induziram nenhuma alteração na viabilidade tecidual de explantes vilosos humanos.

Figura 11. RVI 30 e RVI 33 reduziram significativamente a proliferação de *T. gondii* em explantes vilosos humanos.

Figura 12. Ultraestrutura do parasita após exposição aos tratamentos com RVI30 e RVI33.

Figura 13. Esquema resumindo os efeitos de RVI 30 e RVI 33 contra a infecção por *T. gondii* em modelos da interface materno-fetal humana.

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : características gerais.....	11
1.2. A transmissão vertical e a população celular presente na placenta.....	13
1.3. Epidemiologia.....	16
1.4. Resposta imune sistêmica e gestacional.....	17
1.5. Tratamento convencional e pesquisa sobre formas alternativas de tratamento para a toxoplasmose: estabelecimento de novos compostos químicos sintéticos.....	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 Preparação dos compostos RVI 30 e RVI 33.....	24
3.2 Cultura de células BeWo e taquizoítos de <i>T. gondii</i>	24
3.3 Ensaio de viabilidade celular em células BeWo.....	25
3.4 Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo tratadas com RVI 30 e RVI 33.....	25
3.5 Ensaio de reversibilidade.....	26
3.6 Invasão de <i>T. gondii</i> em células BeWo infectadas com taquizoítos pré-tratados com RVI 30 e RVI 33.....	27
3.7 Adesão e invasão de <i>T. gondii</i> após pré-tratamento de células BeWo com RVI 30 e RVI 33.....	27
3.8 Cultura de explantes vilosos de amostras de placenta humana a termo.....	28
3.9 Viabilidade de explantes vilosos humanos tratados com RVI 30 e RVI 33.....	29
3.9.1 Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em explantes vilosos humanos tratados com RVI 30 e RVI 33.....	29
3.9.2 Dosagem de citocinas por ELISA.....	31
3.9.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	31
3.9.4. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	32
4.1. RVI 30 e RVI 33 reduziram a viabilidade das células BeWo apenas em altas concentrações.....	32
3.2. RVI 30 e RVI 33 foram capazes de reduzir a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células BeWo.....	32
3.3. RVI 30 e RVI 33 demonstraram um efeito anti- <i>T. gondii</i> irreversível de maneira dose-dependente.....	33
3.4. RVI 30 e RVI 33 apresentaram uma ação direta sobre taquizoítos de <i>T. gondii</i>	33

<i>3.5. Células BeWo tratadas diretamente com RVI 30 e RVI 33 demonstraram invasão reduzida de T. gondii</i>	34
<i>3.6. Células BeWo infectadas com T. gondii e tratadas com RVI 30 ou RVI 33 aumentaram MIF, enquanto apenas RVI 30 reduziu IL-8</i>	34
<i>3.7. RVI 30 e RVI 33 não causaram nenhuma alteração na viabilidade tecidual de explantes vilosos humanos</i>	35
<i>3.8. RVI 30 e RVI 33 reduziram significativamente a proliferação de T. gondii em explantes vilosos humanos</i>	36
<i>3.9. Tratamento com RVI 30 e RVI 33 promoveram alterações ultraestruturais na morfologia intracelular do parasita</i>	36
<i>3.9.1 Modelo proposto para a ação de RVI 30 e RVI 33 durante a infecção por T. gondii na interface materno-fetal humana</i>	37
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	41
7. FIGURAS	42

RESUMO

O tratamento convencional para toxoplasmose congênita depende principalmente de uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina. No entanto, a terapia com esses medicamentos está associada a efeitos colaterais severos e resistência, o que torna necessária a exploração de novas estratégias terapêuticas. Atualmente, estudos estão em andamento com compostos químicos, incluindo aqueles baseados em benzimidazol e núcleos piridínicos, demonstrando ações eficazes contra vários patógenos, incluindo protozoários. Neste estudo específico, investigamos os efeitos de dois novos compostos, nomeadamente RVI 30 e RVI 33, em células BeWo e explantes de vilosidades placentárias humanas do terceiro trimestre quando infectadas com *Toxoplasma gondii*. Para este fim, células BeWo e explantes foram infectados ou não com *T. gondii*, tratados com RVI 30 ou RVI 33 e analisados quanto à toxicidade, adesão do parasita, invasão e proliferação, bem como produção de citocinas. Em adição, células BeWo foram infectadas com taquizoítos pré-tratados com RVIs e observamos a taxa de invasão. Finalmente, a ultraestrutura parasitária foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão para averiguar o efeito dos compostos nos parasitos. Nossos resultados mostraram que ambos os compostos não induziram toxicidade em baixas concentrações e foram capazes de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células previamente infectadas. Além disso, demonstraram ação antiparasitária irreversível em células BeWo. Posteriormente, a invasão de *T. gondii* foi atenuada quando as células BeWo foram infectadas com taquizoítos pré-tratados. Finalmente, as células BeWo infectadas tratadas com RVI 30 e RVI 33 aumentaram o MIF e diminuíram a IL-8 quando tratadas apenas com RVI 30. Além disso, os compostos reduziram a proliferação de *T. gondii* em explantes humanos, sem alterações significativas na produção de citocinas. Finalmente, ambos os compostos induziram alterações significativas na morfologia dos taquizoítos. Em resumo, RVI 30 e RVI 33 apresentaram diferentes atividades antiparasitárias dependendo do modelo experimental, destacando a ação direta sobre taquizoítos como um mecanismo comum em ambas as células e vilosidades. Com base nesses achados, RVI 30 e RVI 33 são sugeridos como alvos promissores para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas contra toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, gravidez, tratamento, compostos químicos, trofoblasto

ABSTRACT

The conventional treatment for congenital toxoplasmosis primarily relies on a combination of sulfadiazine and pyrimethamine. However, therapy with these drugs is associated with severe side effects and resistance, necessitating the exploration of new therapeutic strategies. Currently, studies are underway with chemical compounds, including those based on benzimidazole and pyridine derivatives, demonstrating effective actions against several pathogens, including protozoans. In this particular study, we investigated the effects of two new compounds, namely RVI 30 and RVI 33, in BeWo cells and human third-trimester placental villi explants when infected with *Toxoplasma gondii*. For this purpose, BeWo cells and explants were infected or not with *T. gondii*, treated with RVI 30 or RVI 33 and analyzed for toxicity, parasite adhesion, invasion and proliferation, as well as cytokine production. Additionally, BeWo cells were infected with RVIs-pretreated tachyzoites and we observed invasion rate. Finally, the tachyzoites were observed regarding to ultrastructural changes when treated with both compounds. Our results showed that both compounds did not induce toxicity at low concentrations and were capable of reducing *T. gondii* intracellular proliferation in previously infected cells. Furthermore, they demonstrated irreversible antiparasitic action in BeWo cells. Subsequently, *T. gondii* invasion was attenuated when BeWo cells were infected with pretreated tachyzoites. Finally, infected BeWo cells treated with RVI 30 and RVI 33 upregulated MIF and decreased IL-8 when treated only with RVI 30. Moreover, the compounds reduced *T. gondii* proliferation in human explants, with no significant changes in cytokine production. Finally, important changes were detected in the parasite morphology when BeWo cells were treated with both compounds. In summary, RVI 30 and RVI 33 exhibited different antiparasitic activities depending on the experimental model, highlighting direct action on tachyzoites as a common mechanism in both cells and villi. Based on these findings, RVI 30 and RVI 33 are suggested as promising targets for the establishment of new therapeutic strategies against congenital toxoplasmosis.

Key words: *Toxoplasma gondii*, pregnancy, treatment, chemical compounds, trophoblast

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. *Toxoplasma gondii*: características gerais

Toxoplasma gondii é o responsável pela toxoplasmose, uma zoonose de relevância significativa (ATTIAS et al., 2020; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). É um microorganismo parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e família *Sarcocystidae* (FERGUSON, 2009). Este microorganismo representa a única espécie dentro do gênero *Toxoplasma*, mas apresenta uma estreita relação com *Neospora caninum* e *Hammondia hammondi*, compartilhando características morfológicas, moleculares e de ciclo de vida (SMITH et al., 2021). *Toxoplasma gondii* foi inicialmente identificado em 1908 por Nicolle e Manceaux em *Ctenodactylus gondii*, um roedor norte-africano, e por Splendore em coelhos no território brasileiro (FERGUSON, 2009; FERGUSON et al., 2005).

O ciclo infeccioso deste parasita compreende três estágios fundamentais: esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Os taquizoítos constituem a fase de replicação rápida do parasita no organismo do hospedeiro, sendo detectados durante a fase aguda da infecção (DUBEY et al., 2012). Apresentam uma forma que lembra um arco, uma banana ou meia-lua, desenvolvendo-se no interior do vacúolo parasitóforo de diversas células hospedeiras e mostrando-se pouco resistentes à ação do suco gástrico estomacal (WARSCHKAU; SEEBER, 2023). Os bradizoítos, também conhecidos como cistozoítos, representam o estágio persistente da infecção na fase crônica. Podem se desenvolver em diversos órgãos, incluindo fígado, pulmão, rim, sendo mais prevalentes no sistema nervoso central, região ocular e músculos esqueléticos e cardíaco. Sua multiplicação ocorre de maneira lenta e gradual por meio de processos conhecidos como endodigenia ou endopoligenia (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Os esporozoítos são encontrados exclusivamente nos felídeos, sejam domésticos ou selvagens, que representam os hospedeiros definitivos. Observa-se que dezessete espécies de felídeos foram identificadas como capazes de eliminar, por meio de suas fezes, oocistos contendo esporozoítos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O ciclo de vida modifica-se tanto na fase definitiva (ciclo sexuado) quanto na intermediária (ciclo assexuado), sendo identificado como heteroxênico. A forma de propagação diverge conforme as características físicas e os hábitos de higiene da

comunidade local (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).A infecção por *T. gondii* em humanos ocorre principalmente pela ingestão de carne crua ou malcozida proveniente de bovinos, caprinos, suínos ou aves que contenham cistos teciduais. Outras vias de transmissão incluem o contato com fezes de felídeos contaminados por oocistos, a ingestão de água ou alimentos contaminados também por oocistos, transplantes de órgãos e a transmissão vertical das formas taquizoítas (ATTIAS et al., 2020).

Durante a etapa assexuada, um organismo intermediário, como o ser humano, consome oocistos, cistos ou taquizoítos. A penetração na célula é um processo ativo. O parasita adere e invade a célula hospedeira por meio da expressão e liberação de proteínas das organelas micronemas (MICs) e roptrias (ROPs) localizadas na região apical do parasito (SARDINHA-SILVA et al., 2017; HORTA et al., 2020). As micronemas (MICs) desempenham um papel crítico nos estágios iniciais da infecção da célula hospedeira (FOROUTAN-RAD et al., 2016), enquanto as roptrias (ROPs) desempenham um papel crucial na ativa penetração do parasita na célula hospedeira e estão diretamente envolvidas na formação do vacúolo parasitóforo, um compartimento intracelular distintivo onde o parasito se reproduz intensamente e evita a detecção intracelular (FOROUTAN et al., 2019). No interior do organismo, ocorre uma intensa replicação celular na forma de taquizoítos. Após uma entrada ativa nas células hospedeiras do epitélio intestinal, esses taquizoítos invadem ativamente novas células, formando o vacúolo parasitóforo e se multiplicando de maneira rápida (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Posteriormente, a célula hospedeira se rompe, liberando os taquizoítos que, por sua vez, invadem novas células. Essa etapa é identificada como proliferativa e representa a fase aguda da infecção. A transição para a fase crônica envolve a formação de cistos em resposta ao sistema imunológico do hospedeiro. (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HALONEN; WEISS, 2013) são os taquizoítos que, por sua vez, invadem novas células. Essa etapa é identificada como proliferativa e representa a fase aguda da infecção. A transição para a fase crônica envolve a formação de cistos em resposta ao sistema imunológico do hospedeiro. (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HALONEN; WEISS, 2013).

A fase sexuada ocorre apenas no intestino delgado de alguns felídeos (BETANCOURT-CONDE et al., 2021). Esse ciclo se desdobra em uma sequência precisa de etapas, destacando a engenhosidade evolutiva do parasita para garantir sua sobrevivência e disseminação eficaz. Os felinos ingerem oocistos esporulados ou cistos

teciduais. No estômago do animal, os oocistos liberam os esporozoítos que, em resposta às condições ácidas gástricas, migram para a mucosa gástrica e, em seguida, para o epitélio intestinal. A penetração ativa nas células intestinais, conhecidas como enterócitos, desencadeia um processo denominado esquizogonia, resultando na formação de esquizontes multinucleados (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Ao longo de vários dias, ocorrem esquizogonias sucessivas nas células epiteliais intestinais, culminando na formação de merozoítos. Esses merozoítos, por sua vez, geram microgametas (masculinos) e macrogametas (femininos) após múltiplas gerações, revelando a complexidade do desenvolvimento parasitário (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; NAHOULI et al., 2017). A fertilização entre os gametas masculino e feminino resulta na formação de um zigoto diploide, que se desenvolve dentro dos oocistos. Esses oocistos não esporulados são excretados no ambiente juntamente com as fezes dos gatos em grande quantidade. A fase crítica acontece quando esses oocistos entram em contato com o ambiente externo e, sob condições ambientais favoráveis, esporulam, tornando-se infecciosos para outros hospedeiros que possam ingeri-los acidentalmente. Assim, o ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* se completa, assegurando sua disseminação e a continuidade de sua presença na natureza (DELGADO BETANCOURT et al., 2019; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.2. A transmissão vertical e a população celular presente na placenta

Uma das manifestações mais severas da toxoplasmose é a forma congênita. A transmissão congênita ocorre durante a toxoplasmose aguda quando os taquizoítos presentes no sangue podem atravessar a placenta e infectar o feto ou embrião (WUJCICKA; WILCZYŃSKI; NOWAKOWSKA, 2014). O risco de transmissão varia de acordo com a fase gestacional em que ocorre a infecção. À medida que a idade gestacional aumenta, observa-se um aumento no risco de transmissão, embora a severidade da doença diminua nesse cenário (BERGER et al., 2009). Além disso, fatores como a resposta imunológica, a virulência da cepa parasitária e as disparidades nos genótipos também podem influenciar a gravidade da condição (DEGANICH; BOUDREAU; BENMERZOUGA, 2022; GILBERT et al., 2008). Embora a transmissão usualmente ocorra da mãe para o feto quando a infecção é adquirida durante a gestação (BOYER et al., 2005), em casos de mães cronicamente infectadas, a

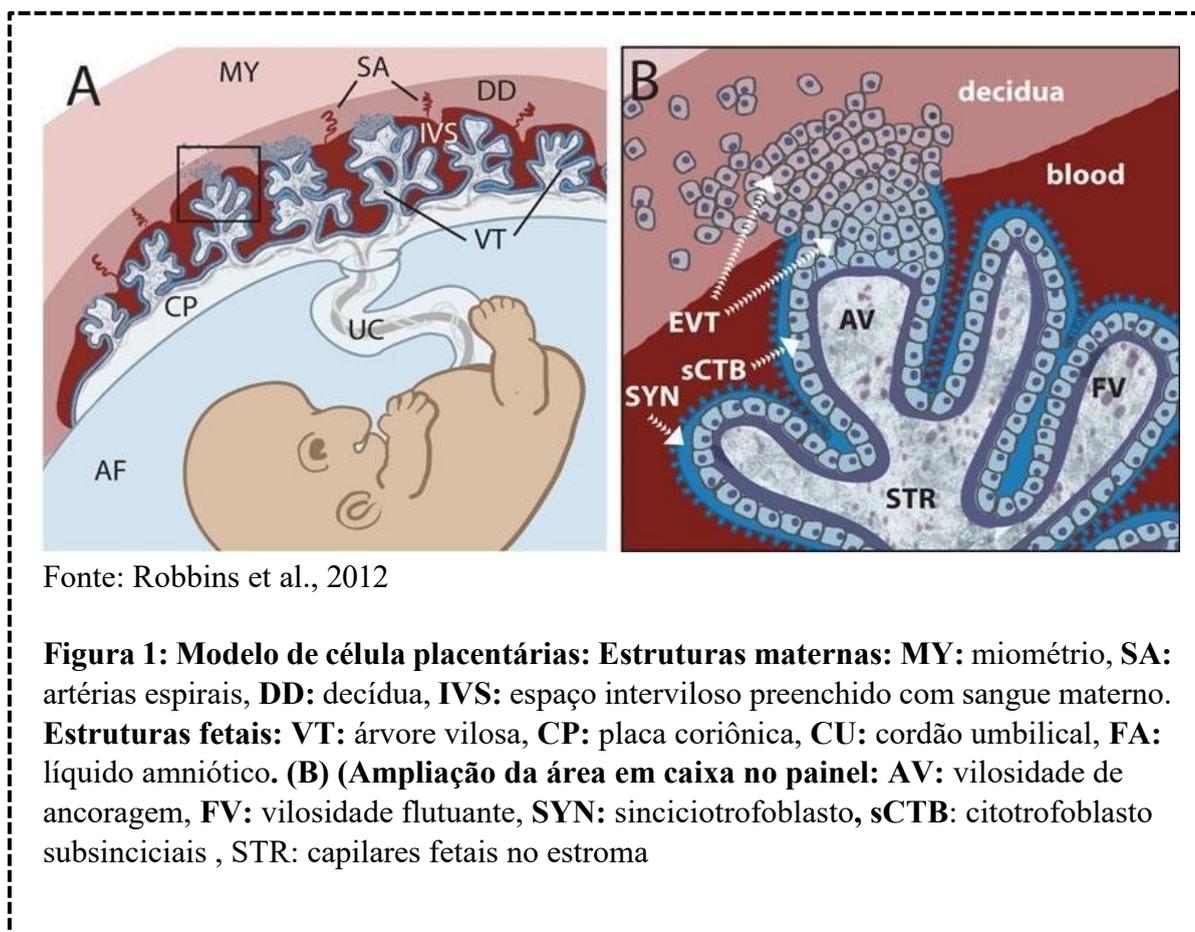
transferência para o feto pode ocorrer se houver reativação da infecção durante a gravidez. A reativação de uma infecção prévia pode ocorrer em situações em que a mãe apresenta um comprometimento imunológico significativo, como exemplo as gestantes que possuem a síndrome da imunodeficiência adquirida (MITCHELL et al., 1990).

A placenta é um órgão temporário e endócrino, com atividade significativa ao longo de toda a gestação. Um dos eventos essenciais no início da gravidez é a formação de subpopulações de trofoblastos, desempenhando um papel crucial na implantação e na formação da placenta. Os trofoblastos que compõem a placenta têm sua origem no trofoectoderma embrionário, representando a primeira linhagem celular de desenvolvimento nos mamíferos (KNÖFLER et al., 2019).

As vilosidades placentárias consistem em três camadas de componentes, cada uma contendo diferentes tipos de células: a primeira é sinciciotrofoblastos/citotrofoblastos, que revestem toda a superfície da árvore vilosa e entram em contato com o sangue materno no espaço interviloso, a segunda população é composta pelas células mesenquimais, macrófagos derivados do mesênquima (células de Hofbauer) e fibroblastos, que estão localizados no estroma do núcleo viloso, entre os trofoblastos e os vasos fetais. E, por fim, a terceira população corresponde às células vasculares fetais, que compreendem células musculares lisas vasculares, células perivasculares e células endoteliais.(KNÖFLER et al., 2019).

Os trofoblastos vilosos, representantes da primeira camada celular das vilosidades placentárias, são caracterizados por duas populações distintas de células: citotrofoblastos indiferenciados e sinciciotrofoblastos totalmente diferenciados (LAWLESS et al., 2023). Os sinciciotrofoblastos formam uma camada contínua e especializada de células epiteliais multinucleadas, cobrindo toda a superfície das vilosidades da árvore e estabelecendo contato direto com o sangue (ELLERY et al., 2009). Quando se trata da comunicação entre o feto e a mãe, são principalmente os trofoblastos sincicializados que coordenam as interações biomoleculares complexas entre ambos. Os trofoblastos placentários desempenham um papel crucial, não apenas ao fornecer barreiras estruturais e bioquímicas entre os compartimentos materno e fetal durante a gravidez, mas também atuam como um órgão endócrino significativo. Estas células produzem uma variedade de fatores de crescimento e hormônios, desempenhando um papel vital no suporte e na regulação do desenvolvimento e crescimento tanto da placenta quanto do feto (ELLERY et al., 2009). Abaixo do sinciciotrofoblasto, encontramos o citotrofoblasto. Essas células

são consideradas as células-tronco dos sinciotrofoblastos (LAWLESS et al., 2023). Ao longo da formação e desenvolvimento das vilosidades, os citotrofoblastos passam por diferenciação contínua, transformando-se em sinciotrofoblastos. Em adição, o citotrofoblasto ultrapassa a barreira do sinciotrofoblasto, se torna o trofoblasto extraviloso e promove a invasão das artérias espiraladas uterinas, fenômeno essencial na regulação do fluxo sanguíneo para o sucesso gestacional (APLIN; LEWIS; JONES, 2018).



Fonte: Robbins et al., 2012

Figura 1: Modelo de célula placentária: Estruturas maternas: MY: miométrio, **SA:** artérias espirais, **DD:** decídua, **IVS:** espaço intervilososo preenchido com sangue materno. **Estruturas fetais: VT:** árvore vilosa, **CP:** placa coriônica, **CU:** cordão umbilical, **FA:** líquido amniótico. **(B) (Ampliação da área em caixa no painel: AV:** vilosidade de ancoragem, **FV:** vilosidade flutuante, **SYN:** sinciotrofoblasto, **sCTB:** citotrofoblasto subsinciciais, **STR:** capilares fetais no estroma

A escolha de células trofoblásticas representa uma ferramenta essencial no estudo da placenta e das infecções desencadeadas por *T. gondii* na interface materno-fetal (ABBASI et al., 2003; ROBBINS et al., 2012). Atualmente, diversas linhagens celulares servem como modelos *in vitro* de células trofoblásticas humanas. Um exemplo é a linhagem HTR-8 SV/neo, derivada do trofoblasto extraviloso e desenvolvida por Graham e colaboradores em 1993. Outras células relevantes incluem BeWo, JEG-3 e JAR, que

representam modelos de citotrofoblasto viloso e são amplamente empregadas em estudos *in vitro* (HEATON et al., 2008, ROSINI et al., 2022). Em resumo, o estudo das células trofoblásticas é vital para compreender as interações entre o organismo materno e o parasita *Toxoplasma gondii* durante a infecção. Essas células, escolhidas como ferramentas essenciais, oferecem *insights* valiosos sobre a dinâmica da infecção na interface materno-fetal, contribuindo para a compreensão dos mecanismos subjacentes à patogênese. A seleção cuidadosa de linhagens celulares, como modelos *in vitro*, é crucial para avançar o conhecimento e potencialmente abrir caminho para terapias mais eficazes.

1.3. Epidemiologia

A toxoplasmose é uma das infecções mais prevalentes em humanos e animais de sangue quente, com uma distribuição global. Essa infecção foi identificada em praticamente todas as espécies de mamíferos e em muitas espécies de aves (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; PAUL et al., 2018). Em seres humanos, a toxoplasmose está presente em todas as regiões do mundo, afetando aproximadamente um terço da população mundial. No entanto, a incidência da toxoplasmose varia, sendo mais elevada em países subdesenvolvidos em comparação com os países desenvolvidos. Regiões com alta prevalência incluem América Latina, partes da Europa Oriental/Central, Oriente Médio e algumas áreas do sudeste asiático e da África (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). A taxa de prevalência em gestantes pode chegar a 41,8% na Índia, 41% no Irã e 49% na Malásia (PAUL et al., 2018). No Brasil varia em torno de 36 a 92%, sendo considerado uma das maiores em relação à média global (FOROUTAN-RAD et al., 2016). Todos estes dados epidemiológicos tornam a toxoplasmose, especialmente a forma congênita da infecção, um grande problema de saúde pública.

A toxoplasmose congênita emerge como uma preocupação significativa para a saúde pública, tanto no âmbito nacional quanto global. No Brasil, estatísticas revelam que, a cada 10.000 nascimentos, de 5 a 23 crianças apresentam infecção congênita por *T. gondii*, correndo o risco de enfrentar complicações neurológicas, cegueira, retardamento mental e lesões oculares (DUBEY et al., 2012). Em uma pesquisa realizada no estado de Minas Gerais, 190 casos de toxoplasmose congênita foram confirmados em um grupo de 146.307 recém-nascidos examinados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG), resultando em uma taxa de positividade de 0,13% para *T. gondii* entre as crianças da região (CARELLOS et al., 2014).

Na cidade de Santa Maria, localizada no estado do Rio Grande do Sul, região sul do Brasil, houve um surto de toxoplasmose em abril de 2018, afetando a população em geral, incluindo gestantes e seus fetos. A água foi apontada como possível meio de transmissão da doença. Dados oficiais relataram 2.270 casos com mais de 900 casos confirmados. Destes, 146 casos ocorreram em mulheres grávidas (NUNES DO REGO; SILVA et al., 2019).(NUNES DO REGO; SILVA et al., 2019).

Diante desse cenário, é imperativo desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas para controlar a transmissão vertical de *T. gondii*. Isso não apenas beneficia o Brasil, mas também contribui para esforços globais, pois a redução da incidência de infecções congênitas tem um impacto direto na qualidade de vida das crianças, resultando em menor mortalidade, morbidade e, conseqüentemente, em uma redução dos custos associados ao sistema de saúde público.

1.4. Resposta imune sistêmica e gestacional

A primeira linha de defesa do organismo é conhecida como imunidade inata, que reage de forma imediata à presença de patógenos através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)(ZHANG; OHTO; SHIMIZU, 2017). Nas fases iniciais da infecção, células dendríticas (DC), macrófagos ($M\Phi$), células natural killer (NK) e neutrófilos (Np) colaboram de maneira coordenada para estabelecer a primeira linha de defesa, manifestando uma resposta imunológica inata. Essa resposta imediata culmina no desenvolvimento subsequente da imunidade adaptativa(DENKERS et al., 2004; SANA et al., 2022) .

Quando os PRRs reconhecem os ligantes, resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-6 e IL-12, desempenhando um papel crucial na ativação subsequente das respostas imunológicas (SASAI; YAMAMOTO, 2019). As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel fundamental no desencadeamento e na sustentação da imunidade inata e adquirida, contribuindo para limitar a proliferação do parasita. As células apresentadoras de antígenos (APCs) e células do sistema imunológico adaptativo, como células B e T, são extremamente importantes na produção destas citocinas (SANA et al., 2022). A IL-12, por sua vez, estimula a produção de interferon-gama (IFN- γ), um mediador fundamental da imunidade tanto em humanos quanto em camundongos (SHER; TOSH; JANKOVIC, 2017). Essa indução de IFN- γ desencadeia uma resposta imunológica protetora do tipo 1 (LIMA; LODOEN, 2019). Além de desencadear a resposta imune mediada por células T,

IFN- γ opera de forma independente para controlar parasitas intracelulares. O IFN- γ promove a degradação do triptofano em fibroblastos humanos, inibindo, assim, a replicação do parasita (PFEFFERKORN, 1984). Além disso, estudos demonstram que TLR4 desempenha importante papel na patogênese da toxoplasmose (ROSINI et al., 2022). A ativação dos TLRs desencadeia vias dependentes do fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88) que resultam na ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) (BOTOS; SEGAL; DAVIES, 2011; ROSINI et al., 2022). A ativação de NF- κ B leva a transcrição de genes e liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de óxido nítrico sintase (iNOS) e alguns receptores semelhantes a NOD (NLRs) (MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011).

A resistência eficaz contra *T. gondii* depende significativamente de uma resposta imune adaptativa. Em infecções humanas, a susceptibilidade aumenta quando ocorrem defeitos primários ou adquiridos na função das células T (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012). Acredita-se que a capacidade das células T CD8⁺ para controlar a infecção crônica esteja relacionada à produção de citocinas, como IFN- γ , ou à expressão de CD40. Adicionalmente, um segundo sinal, envolvendo a ativação TNF- α , desempenha um papel crucial no controle do parasita. Tanto TNF- α quanto CD40 utilizam a via de sinalização através de NF- κ B para regular a parasitemia, contribuindo para um perfil de resposta Th1 (SHER; TOSH; JANKOVIC, 2017). Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham um papel de extrema importância na fase crônica, prevenindo a reativação da toxoplasmose. Portanto, durante a fase avançada da infecção, é essencial a produção de citocinas inflamatórias, bem como a ativação de sinais moleculares, e a interação via CD40. Esses elementos são cruciais para conferir resistência nesta etapa da doença (LIMA; LODOEN, 2019).

Durante o período gestacional, as células trofoblásticas expressam receptores que podem identificar uma diversidade de agentes patogênicos. Após o reconhecimento, o trofoblasto secreta citocinas específicas que modulam a resposta das células presentes na decídua em relação ao agente patogênico identificado. Além disso, elas liberam mediadores inflamatórios, como MIF e IL-6, que têm a capacidade de modular a atividade dos monócitos, tornando-os aptos a controlar processos infecciosos (CASTRO et al., 2013, GOMES et al., 2018).

Apesar da importância do perfil inflamatório na implantação, durante a gestação ocorre uma polarização para a resposta imunológica do tipo Th2, que é responsável pela

produção de citocinas anti-inflamatórias, favorecendo o desenvolvimento do feto semi-alogênico. Citocinas anti-inflamatórias são liberadas por células maternas, como as NK uterinas, linfócitos, macrófagos, e pelo próprio trofoblasto (CHALLIS et al., 2009).

Há uma transição do perfil Th1, caracterizado por uma resposta pró-inflamatória, para um perfil mais anti-inflamatório Th2 durante o curso da gestação. No entanto, próximo ao momento do parto, ocorre uma modificação no perfil de citocinas, retornando ao perfil Th1, com o propósito de facilitar e estimular o processo de trabalho de parto (DENNEY et al., 2011; YANG et al., 2022). Em síntese, a elevada expressão de citocinas do tipo Th2 durante a gestação pode aumentar a susceptibilidade à toxoplasmose, levando potencialmente a complicações como infecção placentária e fetal. Essa interação entre o sistema imunológico materno e o agente infeccioso destaca a complexidade da resposta imunológica durante a gravidez e ressalta a importância de compreender e gerenciar os fatores que podem influenciar a saúde materna e fetal. Assim, estratégias para monitorar e modular a resposta imunológica podem ser essenciais para proteger a saúde durante a gestação.

1.5. Tratamento convencional e pesquisa sobre formas alternativas de tratamento para a toxoplasmose: estabelecimento de novos compostos químicos sintéticos

O tratamento convencional para toxoplasmose é baseado na associação de dois medicamentos, sulfadiazina (S) e pirimetamina (P), os quais atuam em sinergismo inibindo a síntese de pirimidinas no parasita. Este é o principal tratamento recomendado para mulheres grávidas com diagnóstico confirmado de toxoplasmose congênita (KONSTANTINOVIC et al., 2019; SILVA et al., 2019). No entanto, esta terapia apresenta alguns efeitos colaterais graves, como supressão da medula óssea, deficiência de ácido fólico, toxicidade hematológica e hipersensibilidade, que podem levar à interrupção do tratamento, além de potenciais efeitos teratogênicos no feto (HERNANDEZ-DIAZ, 2001; OZ, 2014). Além disso, outras terapias podem ser recomendadas, incluindo pirimetamina em combinação com clindamicina, atovaquona, claritromicina ou azitromicina em casos de toxoplasmose congênita, mas seus efeitos ainda são preliminares e, como todos os outros medicamentos, são ineficazes durante a infecção crônica (DUNAY et al., 2018; KONSTANTINOVIC et al., 2019). Considerando

todas essas informações, o estabelecimento de novos medicamentos ou novos compostos para combater a transmissão vertical de *T. gondii* é obrigatório e bem-vindo.

Devido às maiores acessibilidade e aceitação pela população de um modo geral, plantas medicinais e seus compostos isolados são amplamente utilizados para o tratamento e prevenção de diversas doenças (CHERAGHIPOUR et al., 2021). Recentemente, o efeito anti-*Toxoplasma* de várias ervas medicinais, como *Zataria multiflora*, *Eurycoma longifolia*, *Zingiber officinale*, *Myrtus communis*, *Berberis vulgaris*, *Sophora flavescens*, *Nigella sativa*, *Piper betle* e *Allium cepa*, têm sido investigados (MONTAZERI et al., 2017). Outro exemplo é a cúrcuma, uma planta perene da família do gengibre, cientificamente conhecida como *Curcuma longa*. Seu óleo essencial tem amplo efeito anti-inflamatório e demonstrou efeitos inibitórios *in vitro* contra taquizoítos de *T. gondii* (EZZATKHAH; MAHMOUDVAND; RAZIANI, 2023). Nossos estudos prévios demonstraram que óleos-resinas de muitas espécies de *Copaifera* podem controlar a infecção por *T. gondii* por meio da imunomodulação da célula hospedeira, além de exercer efeitos diretos sobre a ultraestrutura parasitária (TEIXEIRA et al., 2020). Outro estudo de nosso grupo de pesquisa também demonstrou que o extrato hidroalcoólico de folhas e óleos-resina de *C. multijuga* exibiram um efeito direto sobre taquizoítos em células trofoblásticas e no explante de vilosidades coriônicas humanas (MARTÍNEZ et al., 2023).

Além do estudo de plantas e seus compostos isolados, outra vertente dentro de tratamentos alternativos é a elaboração de novos compostos químicos sintéticos para o tratamento de várias doenças, incluindo a toxoplasmose. Esses compostos são isolados ou criados em laboratório e possuem características distintas. Motavallihaghi e colaboradores (2023) elaboraram uma molécula de Dimedone (Cyclohexane-1, 3-dione), uma classe de compostos químicos orgânicos, na forma de nanopartículas e observaram maior controle da proliferação de *T. gondii* em modelos *in vitro* e *in vivo*. Em adição, compostos baseados no grupo químico triazole foram otimizados e análogos foram construídos e testados contra *Toxoplasma*, de modo que estes novos compostos foram mais eficazes na redução da infecção parasitária quando comparados aos tratamentos clássicos de sulfadiazina e pirimetamina (WEGLIŃSKA et al., 2022). Uma série de novos compostos contendo o grupo químico quinazolina foram desenhados e testados contra taquizoítas de *T. gondii* e demonstraram potente ação inibitória do crescimento parasitário por possível interação com proteínas da família CDPK1 do parasito (DENG et al., 2021). Também, novo composto derivado do grupamento químico quinolina demonstrou

significante ação anti-*T. gondii* em modelo experimental murino, quando menor carga parasitária foi detectada em fígado e baço de camundongos na fase aguda da infecção, e reduzido número de cistos cerebrais e menores danos patológicos foram observados em camundongos na fase crônica da infecção (ELGAWAD et al., 2019).

Nesse mesmo cenário, destaque vem sendo observado em compostos derivados de núcleos piridínicos e benzimidazol. Núcleos piridínicos correspondem a uma classe de compostos orgânicos que consiste em um anel heterocíclico de seis membros contendo cinco átomos de carbono e um átomo de nitrogênio (TAHIR et al., 2021; YAMONOI et al., 2024). Estudos já determinaram o efeito contra tumores, patógenos, bem como ações anti-inflamatória e contra a diabetes de compostos contendo núcleos piridínicos com diversas substituições e/ou adições químicas (TAHIR et al., 2021). Recentemente, vários trabalhos mostraram que compostos contendo núcleos piridínicos foram efetivos em controlar a proliferação celular de linhagens tumorais de câncer de colo uterino (HeLa), pulmão (A549) e mama (MCF-7) humanos (WANG et al., 2024), bem como de células derivadas de leucemia mieloide aguda (CHEN et al., 2024). Acredita-se que esses compostos possam modular quinases dependentes de ciclinas, como a CDK8 (CHEN et al., 2024), além de induzir expressão de desacetilases de histonas e desestabilizar o citoesqueleto de tubulina (EL-ZOGHBI et al., 2024), atuando, portanto, no controle da proliferação celular. Em adição, núcleos piridínicos também já mostraram ação antimicrobiana, quando estes compostos foram eficientes em inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* (RADWAN et al., 2020), bem como foram potentes como anti-helmínticos em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (ZHOU et al., 2019). Estudos também já investigaram a ação de compostos piridínicos e seus análogos contra protozoários. Masch e colaboradores (2019) demonstraram potente efeito inibidor de núcleos piridínicos contra o crescimento de *Plasmodium falciparum*. Diversos estudos comprovaram o controle da infecção por *Trypanosoma* efetuado por compostos contendo núcleo piridínico (NERES et al., 2007; SALVADOR et al., 2016; RIBEIRO et al., 2021; LAPIER et al., 2019). Um estudo recente mostrou que novos compostos piridínicos foram capazes de reduzir a carga parasitária no fígado, baço e cérebro de camundongos infectados por *T. gondii*. Estes compostos induziram modificações na ultraestrutura dos taquizoítas, danificando seu processo de invasão e replicação intracelular (MONEER et al., 2023).

Compostos derivados de benzimidazol possuem uma estrutura contendo um anel de benzimidazol (um anel aromático condensado contendo átomos de nitrogênio) e um

grupo tiol (SH) ligado a ele. Em um estudo de 2019, um derivado sintetizado de 2-mercaptobenzimidazol exibiu atividade antimicrobiana e anti-tumoral (TAHLAN et al., 2019). Além disso, o 2-mercaptobenzimidazol mostrou um forte efeito anti-inflamatório e analgésico, quando seu uso induziu a redução de alterações gastrointestinais em ratos Sprague-Dawley (KHAN et al., 2020). Estudos recentes investigaram a ação de diversos compostos contendo núcleo de benzimidazol contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, bem como ação tripanomicida, sendo estes mais eficazes que os antibióticos clássicos e nifurtimox, a droga clássica para infecções causadas por *Trypanosoma* (BISTROVÍC et al., 2018), além de serem apontados como alternativas terapêuticas para infecções desencadeadas por *Helicobacter pylori* (ROSTAMI; HADDADI, 2022). Também, vários derivados de benzimidazol estão sendo pesquisados com intuito de melhorar o tratamento da doença de Chagas (LÓPEZ-LIRA et al., 2021). Por fim, estudos também vem relatando compostos baseados em benzimidazol com forte atividade anti-*T. gondii* (NASR et al., 2023; WILKINSON et al., 2014).

Até o presente momento, não há na literatura relatos concretos sobre a ação de compostos químicos sintéticos com núcleos piridínicos e benzimidazol contra infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal humana. Portanto, considerando a importância de se buscar formar alternativas de tratamento e/ou prevenção da toxoplasmose congênita, um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, e considerando que núcleos piridínicos e benzimidazóis mostraram-se eficazes contra diversos patógenos, desde bactérias a protozoários diversos, o presente trabalho de pesquisa se propôs a avaliar a ação anti-*Toxoplasma* de dois novos (inéditos) compostos químicos sintéticos contendo esses núcleos em modelos de interface materno-fetal humana.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral:*

Investigar a possível ação anti-*T. gondii* de novos compostos químicos (inéditos) derivados de núcleos piridínicos e benzimidazóis em modelos experimentais de interface materno-fetal humana infectados representados pelas células BeWo, linhagem de trofoblasto viloso humano (*in vitro*), e vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional (*ex vivo*).

2.2. *Objetivos específicos:*

- Investigar a viabilidade celular e tecidual após tratamento com RVI30 e RVI33;
- Determinar o efeito de RVI30 e RVI33 na proliferação intracelular de *T. gondii*;
- Determinar a possível reversibilidade dos efeitos anti-parasitários de RVI30 e RVI33;
- Avaliar o efeito direto de RVI30 e RVI33 nos taquizoítos de *T. gondii*;
- Avaliar o efeito do tratamento por RVI 30 e RVI 33 em células BeWo na modulação da adesão e invasão parasitária;
- Investigar o perfil de citocinas desencadeado por RVI 30 e RVI 33;
- Analisar a ultraestrutura parasitária após tratamento com RVI30 e RVI33.

3. METODOLOGIA

3.1 Preparação dos compostos RVI 30 e RVI 33

As preparações de ambos os compostos foram realizadas no "Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos (NPCBio)", pertencente ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, Brasil, sob coordenação da Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto. Os compostos químicos foram obtidos por reações de substituição aromática nucleofílica entre 2,6-dicloro-3-nitro piridina (1) e 2-mercapto-benzimidazol (2) ou 2-mercapto-benzoxazol (3). 2-mercapto-benzimidazol (2) ou 2-mercapto-benzoxazol (3) foram solubilizados em metanol e um equivalente molar de metóxido de sódio foi adicionado para gerar o nucleófilo. Em seguida, 2,6-dicloro-3-nitro piridina (1) foi adicionada e a reação foi mantida sob agitação e aquecimento por 6 h. O produto final foi cristalizado pela adição de água ao meio reacional e, em seguida, submetido à filtração. As estruturas químicas de ambos os compostos, RVI 30 (C₁₂H₇N₃O₃S) e RVI 33 (C₁₉H₁₀N₄O₄S₂), são mostradas na Fig. 2

3.2 Cultura de células BeWo e taquizoítos de *T. gondii*

As células BeWo foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA), 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 fetal bovino (SFB) (Cultilab) em uma incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Os taquizoítos de *T. gondii* (clone 2F1) expressam o gene da β-galactosidase e foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Vern Carruthers, Escola de Medicina, Universidade de Michigan (EUA). Este clone é derivado da cepa RH, uma cepa do tipo I e altamente virulenta. A inserção do gene da β-galactosidase nestes parasitos permitiu que a quantificação da carga parasitária fosse realizada por ensaio colorimétrico (TEIXEIRA et al., 2020). Os parasitas foram mantidos em frascos de cultura contendo células BeWo em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB a 37°C e 5% de CO₂.

3.3 Ensaio de viabilidade celular em células BeWo

Para verificar o potencial citotóxico de RVI 30 e RVI 33 em células BeWo, realizamos um ensaio colorimétrico usando MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio)] (ROSINI et al., 2022). Em resumo, as células BeWo foram semeadas a $3,0 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços em meio contendo 10% de SFB por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com RVI 30 ou RVI 33 em doses crescentes (0,78 a 200 µM em diluições seriadas) nas mesmas condições de cultura. Como controle, as células BeWo receberam apenas meio de cultura (meio) ou 0,8% de DMSO, a porcentagem usada para diluir a maior dose de ambos os compostos. Após 24 h de tratamento, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com reagente MTT (5 mg/mL, 10 µL) mais 90 µL de meio RPMI 1640 suplementado por 4 h a 37°C e 5% de CO₂, seguido pela adição de 10% de dodecilsulfato de sódio (SDS, Sigma) e 50% de N,N-dimetilformamida (Sigma) com incubação adicional por cerca de 30 min. A absorbância foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços (Leitor de microplacas ELISA VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Relatamos a viabilidade celular em porcentagens (viabilidade celular %), com a absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura considerada 100% viável. Foram conduzidos três experimentos independentes com oito repetições.

3.4 Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo tratadas com RVI 30 e RVI 33

Após averiguar a viabilidade celular, testamos diferentes concentrações não tóxicas de RVI 30 e RVI 33 para seus possíveis efeitos na modulação do crescimento de *T. gondii* em células BeWo usando um ensaio colorimétrico de β-galactosidase. Para esse fim, as células BeWo foram semeadas a $3,0 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços. Após a adesão, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (3:1 - parasitas por célula) em meio RPMI 1640 suplementado por 3 h. Em seguida, o meio foi descartado e as células foram lavadas com meio de cultura para remover o excesso de parasitas extracelulares. Em seguida, as células foram incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO com concentrações não tóxicas de RVI 30 ou RVI 33 em diluições seriadas da seguinte forma: 25 µM; 12,4 µM; 6,25 µM; 3,125µM; 1,56µM e 0,78µM. Sulfadiazina e Pirimetamina (S+P) são consideradas drogas clássicas no tratamento da toxoplasmose congênita, então usamos essa combinação clássica de drogas (200 + 8 µg/mL) como

padrão ouro para avaliar o efeito de ambos os compostos. As concentrações de Sulfadiazina e Pirimetamina foram baseadas em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2017). Como controle negativo, as células BeWo infectadas foram incubadas apenas com meio na ausência de qualquer tratamento. Após 24 h desses diferentes tratamentos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80°C para posterior mensuração de citocinas. Em seguida, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase e a absorbância foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços (Leitor de microplacas ELISA VersaMax) (TEIXEIRA et al., 2020). O número de taquizoítos foi demonstrado em porcentagem (% de proliferação de *T. gondii*), uma vez que o número de parasitas foi comparado a uma curva padrão produzida com taquizoítos livres (variando de 1×10^6 a 15.625×10^3 parasitas). As células BeWo infectadas tratadas apenas com meio de cultura (controle negativo: controle) representaram o crescimento não inibido do parasita. Medimos a eficiência de cada condição de tratamento em comparação com o controle negativo (proliferação de parasitas 100%). Foram conduzidos três experimentos independentes com oito repetições.

3.5 Ensaio de reversibilidade

Para verificar a possível reversibilidade dos efeitos anti-parasitários de ambos os compostos RVI 30 e RVI 33, realizamos um experimento de crescimento do parasita após a remoção total das drogas. As células BeWo foram semeadas a $3,0 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços. Após a adesão, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (3:1) em meio RPMI 1640 suplementado por 3 h. Em seguida, lavamos as células para remover parasitas extracelulares e realizamos este *setup* experimental básico para testar as seguintes duas condições: (1) as células infectadas foram incubadas na presença de RVI 30 ou RVI 33 em concentrações de 6,25 ou 12,5 μ M, S+P (200 + 8 μ g/mL) ou apenas meio de cultura (controle) por 24 h a 37°C e 5% de CO₂; ou (2) as células infectadas foram cultivadas com RVI 30 ou RVI 33 (6,25 ou 12,5 μ M), S+P (200 + 8 μ g/mL) ou apenas meio de cultura (controle) por 24 h, então as células foram lavadas, o meio contendo os tratamentos foi substituído por RPMI 1640 fresco sem tratamentos, e os parasitas foram permitidos crescerem por adicionais 24 h. Em ambas as situações, quantificamos o número de *T. gondii* usando o ensaio de β -galactosidase, conforme mencionado acima (TEIXEIRA et al., 2020). Finalmente, medimos a taxa de reversibilidade após 24 h da remoção do tratamento em comparação com o grupo não

tratado (considerado como 100% de reversibilidade) e a condição de tratamento correspondente às 24 h de tratamento (linha de base para comparação). Foram conduzidos dois experimentos independentes com seis repetições.

3.6 Invasão de *T. gondii* em células BeWo infectadas com taquizoítos pré-tratados com RVI 30 e RVI 33

Os procedimentos experimentais para avaliar o possível efeito direto dos compostos RVI 30 e RVI 33 nos taquizoítos de *T. gondii* foram realizados de acordo com nossos estudos anteriores com pequenas modificações. No primeiro conjunto de experimentos, as células BeWo foram semeadas a $3,0 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços por 24 h em meio RPMI 1640 suplementado. Em seguida, os taquizoítos livres foram pré-incubados por 1 h a 37°C e 5% de CO₂ com duas concentrações iguais de ambos os compostos (6,2µM e 12,5 µM). Nas mesmas condições, os parasitas também foram pré-incubados com S+P (200 + 8 µg/mL) ou apenas com meio de cultura (grupo não tratado: controle). Em seguida, os parasitas pré-tratados foram ressuspensos em meio livre de tratamento, adicionados em placas de cultura de 96 poços contendo células BeWo previamente aderidas, na proporção de 3:1, e os parasitas foram permitidos a invadir por 3 h. Finalmente, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi quantificada usando o ensaio de β-galactosidase (TEIXEIRA et al., 2020) como mencionado acima. Foram conduzidos dois experimentos independentes com seis repetições.

3.7 Adesão e invasão de *T. gondii* após pré-tratamento de células BeWo com RVI 30 e RVI 33

Num esforço para corroborar nosso último ensaio de invasão de parasitas, o ensaio de coloração diferencial de anticorpos vermelho/verde foi usado para abordar a interferência dos dois compostos na adesão e invasão do parasita, conforme descrito anteriormente. Resumidamente, as células BeWo (5×10^4 células/poço/500 µL) foram cultivadas por 24 h em lamínulas de vidro redondas de 13 mm em placas de 24 poços. Em seguida, as células foram pré-tratadas por 24 h com diluições seriadas de RVI 30 ou RVI 33 (6,25; 12,5; 25 µM) ou S+P (200 + 8 µg/mL). Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas e infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (3:1) por 3 h. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS1x para remover os parasitas extracelulares e fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 min à temperatura ambiente. Para marcar os parasitas aderidos, as lamínulas foram incubadas por 1 h com anticorpo

policlonal de coelho anti-*T. gondii* (Abcam #20530; Waltham, MA, EUA), diluído 1:500 em PGN (PBS contendo 0,25% de gelatina) à temperatura ambiente. Em seguida, para corar os parasitas intracelulares, as lamínulas foram incubadas por 1 h a 4 °C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-*T. gondii* [SAG1/p30 (Abcam TP3#ab8313)], diluído 1:500 em solução PGN-0,01% de saponina.

A solução de saponina foi usada para permeabilizar as células, permitindo que o anticorpo monoclonal primário marcasse os parasitas intracelulares. Em seguida, as lamínulas foram cuidadosamente lavadas e incubadas com IgG de camundongo conjugada a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, #A11001; Waltham, MA, EUA), IgG de coelho conjugada a Alexa Fluor 594 (Invitrogen, #A11012) e TO-PRO-3 (Life Technologies, Waltham, MA, EUA), todos diluídos 1:500 em solução PGN-0,01% de saponina por 1 h no escuro a 4°C. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e analisadas usando microscopia de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha) com um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 200 M). O número de taquizoítos intracelulares (verde) e extracelulares (vermelho, vermelho+verde (amarelo)) foi contado. Foram realizados dois experimentos com seis repetições.

3.8 Cultura de explantes vilosos de amostras de placenta humana a termo

Placentas humanas de terceiro trimestre gestacional (n = 6) foram adquiridas após parto cesariano (36-40 semanas de gestação) no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), MG, Brasil. Os tecidos placentários foram coletados apenas quando as gestantes não apresentavam evidências de pré-eclâmpsia, hipertensão, doença cardíaca, diabetes, doenças infecciosas como toxoplasmose ou outras manifestações que pudessem interferir nos resultados deste estudo. A coleta de tecido placentário foi autorizada de acordo com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil (Número de Aprovação: 5.812.532) (Anexo I). Após a coleta, o tecido placentário foi lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril para remover qualquer excesso de sangue, e a dissecação dos vilos foi realizada usando um estereomicroscópio para eliminar o tecido endometrial e membranas fetais até 30 min após a coleta. Vilos coriônicos flutuantes terminais foram subsequentemente coletados, colocados em placas de 96 poços (um por poço) e cultivados em 200 µL de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. O volume dos explantes vilosos foi aproximadamente de ~10 mm³.

3.9 Viabilidade de explantes vilosos humanos tratados com RVI 30 e RVI 33

A possível toxicidade de ambos os compostos em explantes vilosos humanos foi investigada usando o ensaio de MTT conforme descrito anteriormente com pequenas modificações. Os explantes vilosos foram coletados e cultivados em meio RMPI 1640 suplementado por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram tratados com os compostos (RVI 30 ou RVI 33) em concentrações de 200 µM; 100 µM; 50 µM; 25 µM; 12,4 µM; 6,25 µM; 3,125 µM; 1,56 µM ou 0,78 µM. Em paralelo, os explantes foram tratados com 1,2% de DMSO em meio RPMI 1640, a maior concentração usada para diluir os compostos. Como controle de viabilidade celular, os explantes vilosos foram tratados apenas com meio de cultura (controle). Após 24 h de tratamento, os sobrenadantes de cultura foram descartados e substituídos por 200 µL de solução MTT [180µL de meio de cultura mais 20µL de MTT (5 mg/mL)] por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, o cristal de formazan resultante da redução do MTT foi solubilizado pela adição de 100 µL de PBS contendo dodecil sulfato de sódio (SDS, 10%) e HCl (0,01 M, 18 h, 37 °C, 5% CO₂). Finalmente, os vilos foram removidos de cada poço e a absorbância (570nm) foi medida com um espectrofotômetro (Leitor de Microplacas ELISA VersaMax). A viabilidade do tecido foi expressa em porcentagens (% de viabilidade pela incorporação de MTT), sendo que a absorbância dos vilos incubados apenas com meio de cultura (grupo não tratado) foi considerada 100% viável. Além disso, realizamos análise morfológica dos vilos tratados para corroborar os ensaios de viabilidade. As seções de tecido viloso foram coradas com hematoxilina/eosina e examinadas sob microscópio óptico (BX40 Olympus, Tóquio, Japão). Três experimentos independentes foram conduzidos com oito repetições.

3.9.1 Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes vilosos humanos tratados com RVI 30 e RVI 33

Quantificamos a proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes vilosos humanos tratados com RVI 30 ou RVI 33 usando um ensaio de β-galactosidase colorimétrico, conforme mencionado acima com pequenas modificações (TEIXEIRA et al., 2020). Resumidamente, os vilos foram coletados e cultivados em microplacas de 96 poços (um vilo por poço/200 µL) em meio de cultura suplementado por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, os vilos foram infectados ou não com taquizoítos de *T. gondii* (1×10⁶ parasitas por poço) e incubados por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, lavamos os

poços várias vezes com meio de cultura para remover parasitas não aderentes. Seguindo nossos dados de viabilidade tecidual (MTT), os vilos infectados foram tratados por mais 24 h com ambos os compostos nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5 ou 6,25 μM , e S+P (15+ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (SILVA et al., 2017). Sob as mesmas condições experimentais, explantes vilosos não infectados e não tratados ou infectados e não tratados foram cultivados apenas com meio de cultura. Finalmente, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80°C para mensuração de citocinas. Além disso, os explantes também foram coletados e armazenados a -80°C para as seguintes análises: determinação do teor de proteína usando reagente de Bradford (Bradford, 1976) e proliferação intracelular de *T. gondii* por ensaio de β -galactosidase (TEIXEIRA et al., 2020).

Inicialmente, os explantes vilosos congelados foram homogeneizados pela adição de 150 μL de tampão de ensaio de imunoprecipitação radioativa (RIPA) [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% (p/v) deoxicolato de sódio e 0,1% (p/v) SDS, pH 7,5] contendo coquetel de inibidores de protease (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha). O homogeneizado foi centrifugado a $21.000 \times g$ por 15 min a 4°C , e o sobrenadante foi coletado para medir a quantidade total de proteína usando o método de Bradford (Bradford, 1976). A determinação da proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes vilosos foi realizada com 20 μL de sobrenadante de cada amostra. Os sobrenadantes foram incubados com 160 μL de tampão de ensaio (PBS 100 mM, pH 7,3, β -mercaptoetanol 102 mM e MgCl_2 9 mM) e 40 μL de CPRG (clorofenol vermelho- β -D -galactopiranosídeo; Roche) 6,25 mM por aproximadamente 30 min. Medimos a absorbância a 570 nm usando um leitor de placas. O número de taquizoítos de *T. gondii* foi normalizado de acordo com a concentração total de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada explante obtido pelo ensaio de Bradford, e expresso como o número de parasitas por μg de tecido. O número de taquizoítos foi calculado em comparação com uma curva padrão de taquizoítos livres (variando de 1×10^6 a 15.625×10^3 parasitas). Como controles, quantificamos o número de taquizoítos de vilos não tratados e infectados incubados apenas com meio de cultura (controle negativo), esta condição foi considerada como 100% de proliferação de parasitas, e o número de parasitas de cada condição de tratamento foi expresso como uma porcentagem de replicação de *T. gondii* em comparação com o controle negativo. Três experimentos independentes foram conduzidos com oito repetições.

3.9.2 Dosagem de citocinas por ELISA

Citocinas humanas (IL-6, IL-8, TNF, MIF e IL-4) foram mensuradas no sobrenadante de células BeWo e explantes vilosos dos diversos tratamentos experimentais descritos acima. Dosagens dessas citocinas nos sobrenadantes foram realizadas usando o ensaio imunoenzimático sanduíche de ligação de anticorpos (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, USA; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os dados foram expressos em pg/mL para BeWo, enquanto para os explantes vilosos, os dados foram normalizados de acordo com a concentração de proteína de cada amostra. Portanto, para os explantes vilosos, os dados sobre citocinas foram obtidos pela razão da concentração de citocina em pg/mL e a concentração total de proteína do ensaio de Bradford em µg/mL, resultando na medição da citocina em pg/µg de tecido. Os limites de detecção foram determinados a partir das curvas padrão de cada citocina: IL-4 e TNF-α (7,8 pg/mL), IL-6 (4,7 pg/mL), IL-8 (3,12 pg/mL) e MIF (31,2 pg/mL).

3.9.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os estudos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizados conforme descrito anteriormente (TEIXEIRA et al., 2020), com as seguintes pequenas alterações. Resumidamente, as células BeWo foram semeadas a $1,0 \times 10^6$ células/poço em microplacas de 6 poços. Após adesão, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* a uma MOI de 3:1 (parasitas:célula) em meio RPMI 1.640 suplementado. Após 3 h de invasão, as células foram lavadas e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂ com RVI 30 (25 µM e 12.5 µM); RVI 33 (25 µM e 12.5 µM); S+P (200 + 8 µg/mL) ou apenas meio de cultura (grupo não tratado). Em seguida, coletamos as células e as fixamos em solução de Karnovsky contendo paraformaldeído a 2% e glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) por 24 h. As amostras foram incubadas por 1 h em tetróxido de ósmio a 1% em solução de cacodilato e tratadas com ferrocianeto de potássio por mais 30 min em temperatura ambiente, seguido de desidratação em concentrações crescentes de etanol e óxido de propileno e inclusão em resina Epon. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e depois analisadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (Hitachi, TM 3000).

3.9.4. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) dos grupos experimentais usando o *Software GraphPad Prisma 8.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste ANOVA de com pós teste de comparação múltipla de Bonferroni, ou Kruskal–Wallis com o teste de comparação múltipla de Dunn, quando apropriado. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. RVI 30 e RVI 33 reduziram a viabilidade das células BeWo apenas em altas concentrações

Primeiramente, avaliamos as concentrações potencialmente tóxicas para as células BeWo na presença de RVI 30 ou RVI 33 por meio do ensaio de MTT. Observou-se que as concentrações mais elevadas de ambos os compostos foram tóxicas para as células (50 a 200 μM) quando comparadas com as células não tratadas (controle) ($P < 0,05$, Fig. 3A, B). Além disso, o DMSO, o veículo utilizado para dissolver ambos os compostos, não alterou a viabilidade celular (Fig. 3). De acordo com esses dados, utilizamos todas as concentrações inferiores a 50 μM de ambos os compostos para verificar a proliferação intracelular do parasita.

3.2. RVI 30 e RVI 33 foram capazes de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo

Para verificar o potencial efeito anti-*Toxoplasma* de RVI 30 e RVI 33, tratamos células BeWo infectadas com ambos os compostos por 24 horas e observamos o crescimento do parasita. Quando as células BeWo foram tratadas com RVI 30, uma redução significativa na replicação do parasita foi verificada de 6,25 a 25 μM em comparação com as células não tratadas (controle, $P < 0,05$, Fig. 4A). Curiosamente, todas as concentrações utilizadas para tratar as células BeWo com RVI 33 foram capazes de diminuir a proliferação de *T. gondii* em relação às células não tratadas ($P < 0,05$, Fig. 4B). Como esperado, a associação de sulfadiazina e pirimetamina (S+P) também reduziu a replicação do parasita se comparada às células não tratadas ($P < 0,05$, Fig. 4A, B).

Assim, RVI 30 e RVI 33 mostraram um potencial efeito anti-*Toxoplasma* em células BeWo. Com base nesses dados, escolhemos as concentrações de 6,25 a 25 μM para os próximos experimentos.

3.3. RVI 30 e RVI 33 demonstraram um efeito anti-*T. gondii* irreversível de maneira dose-dependente

Após observar o potencial efeito anti-*T. gondii* de RVI 30 e RVI 33 em células BeWo, investigamos um possível crescimento reversível do parasita após a remoção total de ambos os tratamentos. Para este fim, as células BeWo foram infectadas com *T. gondii*, tratadas com RVI 30 ou RVI 33 por 24 horas, os tratamentos foram removidos e substituídos por meio fresco sem compostos por mais 24 horas, e a proliferação do parasita foi determinada.

Como observado na Fig. 5, RVI 30 e RVI 33 reduziram o crescimento do parasita, assim como S+P, quando comparados às células não tratadas (controle, $P < 0,05$, Fig. 5A, B, gráficos da esquerda). No entanto, quando os tratamentos foram removidos totalmente e os parasitas permitidos crescer por adicionais 24 horas, apenas as células que receberam a concentração mais alta de ambos os compostos (12,5 μM), assim como S+P, mostraram uma ação irreversível na modulação da carga parasitária em relação às células não tratadas ($P < 0,05$, Fig. 5A, B, gráficos da direita). Assim, RVI 30 e RVI 33 demonstraram um efeito anti-*T. gondii* irreversível de maneira dose-dependente.

3.4. RVI 30 e RVI 33 apresentaram uma ação direta sobre taquizoítos de *T. gondii*

Para que a infecção por *T. gondii* seja bem-sucedida nas células hospedeiras, é necessário o processo de invasão do parasita nessas células. Portanto, qualquer tipo de droga capaz de modular a invasão do parasita será uma boa estratégia terapêutica. Neste sentido, decidimos pré-tratar taquizoítos de *T. gondii* livres com RVI 30 ou RVI 33 e, após 1 hora, esses parasitas foram adicionados em monocamadas de BeWo e permitidos invadir as células por 3 horas. Taquizoítos pré-tratados com todos os compostos (RVI 30, RVI 33 ou S+P) demonstraram menor capacidade de invadir as células BeWo em comparação com taquizoítos não tratados (controle, $P < 0,05$, Fig. 6A, B). Curiosamente, taquizoítos pré-tratados com RVI 30 ou RVI 33 mostraram um índice de invasão mais baixo nas células BeWo quando comparados com S+P ($P < 0,05$, Fig. 6A, B). Assim, podemos concluir que RVI 30 e RVI 33 apresentaram uma ação direta sobre taquizoítos de *T. gondii*.

3.5. Células BeWo tratadas diretamente com RVI 30 e RVI 33 demonstraram invasão reduzida de *T. gondii*

Num esforço para corroborar com nosso ensaio de invasão anterior com parasitos pré-tratados com os compostos, o ensaio de coloração diferencial de anticorpos vermelho/verde foi utilizado para abordar a interferência de RVI 30 e RVI 33 na adesão e invasão do parasita em células BeWo tratadas previamente com ambos compostos. Resumidamente, células BeWo cultivadas em lâminas de vidro redondas de 13 mm foram pré-tratadas com diluições seriadas de RVI30 ou RVI 33 (6,25, 12,5 e 25 μ M) e infectadas com taquizoítos de *T. gondii* para análises posteriores de adesão e invasão.

Como resultado, observamos que as células BeWo pré-tratadas com RVI 30, RVI 33 ou S+P, não apresentaram nenhuma alteração na adesão de *T. gondii* em comparação com células não tratadas (controle, Fig. 7A, B, gráficos da esquerda). Por outro lado, o tratamento das células BeWo com RVI 30, RVI 33 ou S+P induziu um índice de invasão menor (número reduzido de parasitas intracelulares) em relação às células não tratadas (controle, $P < 0,05$, Fig. 6A, B, gráficos da direita). Além disso, células tratadas com RVI 30 (12,5 e 25 μ M) e RVI 33 (6,25 a 25 μ M) apresentaram um menor número de parasitas intracelulares quando comparadas ao tratamento clássico (S+P, $P < 0,05$, Fig. 7A, B, gráficos da direita). Imagens representativas são mostradas na Fig. 7C-F, onde é possível observar um número reduzido de taquizoítos intracelulares (verdes) em células BeWo tratadas com S+P (D), RVI 30 (12,5 μ M, E) e RVI 33 (12,5 μ M, F) em comparação com células não tratadas (C). Portanto, também podemos concluir que RVI 30 e RVI 33 apresentaram uma ação direta sobre as células BeWo.

3.6. Células BeWo infectadas com *T. gondii* e tratadas com RVI 30 ou RVI 33 aumentaram MIF, enquanto apenas RVI 30 reduziu IL-8

Além disso, estávamos interessados em investigar o efeito desses compostos no perfil de citocinas liberadas por células BeWo. Para esse fim, dosamos citocinas nos sobrenadantes de células BeWo tratadas com RVI 30 ou RVI 33 na presença ou ausência de *T. gondii* (Figs. 8 e 9).

Células BeWo não infectadas tratadas com RVI 30 produziram altos níveis de MIF e IL-8 em relação às células não tratadas (controle, $P < 0,05$, Fig. 8A, C). Além disso, o tratamento com RVI 30 em células BeWo não infectadas induziu aumento na produção de IL-6 e IL-8 se comparado a S+P ($P < 0,05$, Fig. 8 B, C). Finalmente, S+P desencadeou

maior liberação de MIF e IL-6 em células BeWo não infectadas ($P < 0,05$, Fig. 8A, B). Quando a infecção estava presente, células não tratadas aumentaram apenas MIF em comparação com células não infectadas/não tratadas (controle, $P < 0,05$, Fig. 8D). Curiosamente, células BeWo infectadas tratadas com RVI 30 desencadearam maior liberação de MIF e, ao mesmo tempo, menor produção de IL-8 em comparação com células não tratadas/infectadas (*T. gondii*, $P < 0,05$, Fig. 8D, F). Além disso, RVI 30 induziu altos níveis de IL-6 em células BeWo infectadas em relação a células tratadas com S+P ($P < 0,05$, Fig. 8E). Por fim, S+P causou aumento e diminuição de MIF e IL-6, respectivamente ($P < 0,05$, Fig. 8D, E).

Em relação ao tratamento com RVI 33, células BeWo não infectadas aumentaram IL-6 e IL-8 em comparação a S+P ou células não tratadas, respectivamente (controle, $P < 0,05$, Fig. 9B, C). Em células não infectadas, S+P desencadeou alta produção de MIF e IL-6 em relação a células não tratadas ($P < 0,05$, Fig. 9A, B). Na presença de *T. gondii*, RVI 33 induziu maior liberação de MIF em comparação a células não tratadas/não infectadas (controle) e células não tratadas/infectadas (*T. gondii*) ($P < 0,05$, Fig. 9D). Finalmente, S+P aumentou MIF e reduziu IL-6 em comparação ao controle ou *T. gondii* ($P < 0,05$, Fig. 9D, E). Nenhuma mudança significativa foi observada para IL-8 na presença de infecção e RVI 33 (Fig. 9F).

Os níveis de TNF e IL-4 mostraram valores abaixo do limite de detecção de acordo com as curvas padrão de ambos os ELISA (dados não mostrados).

3.7. RVI 30 e RVI 33 não causaram nenhuma alteração na viabilidade tecidual de explantes vilosos humanos

Avaliamos quais concentrações seriam tóxicas para explantes humanos quando tratados com RVI 30 ou RVI 33 (Fig. 10). Observou-se que todas as concentrações utilizadas não induziram nenhuma alteração na viabilidade tecidual quando comparadas aos explantes vilosos não tratados (Fig. 10A, B). Além disso, o DMSO (1,2%) não desencadeou nenhuma alteração na viabilidade tecidual (Fig. 10A, B). Além disso, observamos a morfologia dos explantes tratados com RVI 30 (100 e 200 μ M, Fig. 10E, F) ou RVI 33 (100 e 200 μ M, Fig. 10G, H), e nenhuma alteração morfológica significativa foi detectada, uma vez que a camada de trofoblasto (setas) e o mesênquima (M) demonstraram organização celular normal e sem interrupção tecidual em comparação com os explantes não tratados (Fig. 10C) ou tratados com DMSO (Fig. 10D).

3.8. RVI 30 e RVI 33 reduziram significativamente a proliferação de *T. gondii* em explantes vilosos humanos

Para verificar o potencial efeito anti-*Toxoplasma* de RVI 30 e RVI 33 em explantes vilosos humanos, tratamos explantes infectados com ambos os compostos por 24 horas e observamos o crescimento do parasita. Quando os explantes vilosos foram tratados com RVI 30 ou RVI 33, uma redução significativa na replicação do parasita foi verificada com todas as concentrações utilizadas (6,25 a 200 μM) em relação aos vilos coriônicos não tratados ($P < 0,05$, Fig. 11A, B). Além disso, RVI 30 apresentou maior capacidade de reduzir a proliferação do parasita em comparação com sulfadiazina e pirimetamina (S+P) ($P < 0,05$, Fig. 11A). Como esperado, S + P também reduziu a replicação do parasita em comparação com os vilos coriônicos não tratados ($P < 0,05$, Fig. 11A, B). Assim, RVI 30 e RVI 33 reduziram significativamente a proliferação de *T. gondii* em explantes vilosos humanos, além das células BeWo.

Em relação ao perfil de citocinas, não observamos mudanças significativas na produção de citocinas em explantes humanos tratados com RVI 30 ou RVI 33 em comparação com explantes não tratados (dados não mostrados).

3.9. Tratamento com RVI 30 e RVI 33 promoveram alterações ultraestruturais na morfologia do parasita

Fizemos a análise ultraestrutural de taquizoítos intracelulares de *T. gondii* tratados com RVI 30 e RVI33 para investigar o efeito direto dos compostos na morfologia parasitária. Células BeWo foram infectadas e tratadas com 25 μM ou 12.5 μM de RVI 30 ou RVI 33, ou ainda com S+P por 24 h. Em seguida, as células foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células não tratadas abrigaram um vacúolo parasitóforo (Pv) contendo taquizoítos com formato característico em forma de arco, uma rede tubulovesicular bem definida, membrana dupla (setas), grânulo denso (Dg) e mitocôndrias (M), sugerindo um processo endógeno normal de replicação (Fig. 12A). Células infectadas tratadas com S+P resultaram na ruptura de organelas parasitas, e também membranas duplas eriçadas (Fig. 12B). As células infectadas e tratadas com todas as duas concentrações de RVI 30 e RVI 33 apresentaram Pv contendo parasitas com múltiplas estruturas intracelulares semelhantes a vacúolos (Vls), danos na membrana dupla parasitária (setas) e taquizoítos com provável dificuldade

em completar a citocinese, uma vez que o tratamento resultou em interrupção do crescimento (Figs. 12 C-F).

3.9.1 Modelo proposto para a ação de RVI 30 e RVI 33 durante a infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal humana

Com base em nossos resultados, propomos um mecanismo de ação induzido por RVIs durante a infecção por *T. gondii* em células BeWo e explantes humanos (Fig. 13). Quando as células BeWo (à esquerda) ou os explantes vilosos humanos (à direita) foram tratados com RVI 30 ou RVI 33, danos possíveis nas estruturas do parasita puderam ser desencadeados, uma vez que foi observada invasão e proliferação reduzidas de *T. gondii*. Além disso, RVI 30 e RVI 33 causaram uma regulação positiva de MIF, enquanto somente RVI 30 causou modulação negativa IL-8 em células BeWo, e isso contribuiu para o controle do crescimento do parasita. Nenhuma alteração no perfil de citocinas foi verificada nos explantes humanos.

5. DISCUSSÃO

Estudos demonstram que um terço da população global está infectada com *Toxoplasma gondii*, tornando-se uma emergência de saúde pública (HALONEN; WEISS, 2013). A doença pode ser grave em indivíduos imunocomprometidos e crianças infectadas congenitamente. Em geral, a transmissão vertical ocorre quando a mulher adquire a infecção durante a gravidez, representando um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Para cada 10.000 nascimentos no Brasil, de 5 a 23 crianças são infectadas congenitamente por *T. gondii*, levando a potenciais problemas neurológicos, cegueira, retardo mental, lesões oculares e abortos (DUBEY et al., 2012). O tratamento da toxoplasmose geralmente envolve combinações de dois antimicrobianos, mais comumente inibidores da di-hidrofolato redutase (DHFR) (pirimetamina e trimetoprima) e di-hidropteroato sintetase (sulfonamidas, como sulfadiazina, sulfametoxazol e sulfadoxina), que bloqueiam a síntese de ácido fólico (DUNAY et al., 2018). No entanto, esses medicamentos podem causar efeitos teratogênicos no feto (VIJAYALAXMI et al., 2020; HERNANDEZ-DIAZ et al., 2001). Recentemente, nosso grupo de estudo concentrou seus esforços no estabelecimento de novos compostos ou reposicionamento de drogas para o tratamento ou prevenção da toxoplasmose congênita. Expandindo nossa gama de estudos, observamos que o uso de compostos contendo núcleos piridínicos e

benzimidazóis foi eficaz para o tratamento de várias doenças (KUMAR, 2004) incluindo toxoplasmose (WILKINSON et al., 2014). Portanto, nosso objetivo foi investigar a ação de dois novos compostos químicos, baseados em núcleos piridínicos e benzimidazóis, contra a infecção por *T. gondii* em modelos de interface materno-fetal humana.

Inicialmente, examinamos a viabilidade das células BeWo após o tratamento com diferentes concentrações. Observou-se que em concentrações mais altas (50 a 200 μM), houve uma alteração na viabilidade celular em células BeWo tratadas com os compostos. Em seguida, tratamos células BeWo infectadas com *T. gondii* com diferentes concentrações não tóxicas de cada composto por 24 horas. Observamos que todas as doses de RVI 33 demonstraram eficácia na redução da proliferação intracelular do parasita, enquanto RVI 30 mostrou alta eficiência em concentrações variando apenas de 6,25 a 25 μM em células BeWo. Além disso, tanto RVI 30 quanto RVI 33 mostraram ação irreversível sobre o crescimento do parasita de maneira dose dependente. De acordo com nossos dados, diferentes estruturas de benzimidazol têm sido investigadas contra muitos tipos de patógenos, incluindo helmintos (PRANGTHIP et al., 2023), bactérias e fungos (KIM et al., 2024; PRANGTHIP et al., 2023), vírus (MAO et al., 2023; SRIVASTAVA et al., 2023) e doenças desencadeadas por protozoárias como malária, leishmaniose e tripanossomíase (FRANCESCONI et al., 2023). Poucos estudos envolvendo estruturas de benzimidazol como tratamento para toxoplasmose foram conduzidos. Recentemente, uma série de catorze compostos de pirimidino[1,2-a]benzimidazol foi preparada e testada contra *T. gondii* em células Vero, quando dois promissores e seletivos candidatos a medicamentos antiparasitários foram identificados (NASR et al., 2023). Além disso, uma família de inibidores de benzimidazol mostrou boa eficácia contra *T. gondii* em células de fibroblasto humano (WILKINSON et al., 2014), e o triclabendazol exibiu alta seletividade contra *T. gondii* em fibroblasto humano (CORVI et al., 2024). No momento, não existem estudos sobre estruturas de benzimidazol durante a infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal humana. Assim, este é o primeiro estudo a mostrar a capacidade de estruturas de benzimidazol contra a infecção por *T. gondii* em modelos de interface materno-fetal. Observou-se também que no trabalho de Moura e colaboradores (2023) compostos derivados de piridínio ou seja, com núcleo piridínicos apresentaram uma considerável redução na contagem de taquizoítos de *T. gondii* em vários órgãos de BALB/c, em comparação com a pirimetamina, que é atualmente reconhecida como o tratamento padrão para a toxoplasmose.

Para ter sucesso em uma infecção, o parasita precisa aderir à membrana, invadir e multiplicar-se na célula hospedeira (HALL et al., 2011). Portanto, buscamos avaliar se o tratamento com os compostos, RVI 30 ou RVI 33, seria capaz de afetar diretamente a estrutura do parasita. Observamos uma diminuição notável na taxa de invasão do parasita quando taquizoítos foram pré-tratados por 1 hora com RVI 30 ou RVI 33. Acredita-se que ambos os compostos possam atuar diretamente no parasita, alterando suas estruturas morfológicas e/ou fisiológicas. Todas essas informações são parcialmente suportadas pelos dados do ensaio de reversibilidade, onde demonstramos que RVI 30 e RVI 33, em doses mais altas, evitaram a restauração do crescimento do parasita após a remoção do tratamento. Nesta linha de raciocínio, estudos recentes de nosso grupo demonstraram a capacidade de diferentes oleorresinas de *Copaifera* em alterar adesão, invasão e proliferação de *Toxoplasma*, uma vez que a oleorresina induziu modificação ultraestrutural em taquizoítos e interferiu no processo de citocinese (MARTÍNEZ et al., 2023; TEIXEIRA et al., 2020). Além disso, derivados de benzimidazol foram capazes de reduzir o número de amastigotas e promastigotas de *Leishmania mexicana*, uma vez que esses compostos demonstraram inibição potente da enzima arginase desse patógeno (BETANCOURT-CONDE et al., 2021). Curiosamente, o nitazoxanida-N-metil-1H-benzimidazol induziu alterações significativas no nível de expressão de proteínas do citoesqueleto em *Giardia intestinalis*, bem como uma estrutura bulbosa grande incomum na extremidade do flagelo, parasitas mostrando flexão da membrana e uma depressão côncava na região ventral (MATADAMAS-MARTÍNEZ et al., 2016). Foi previamente relatado que compostos à base de Tris-1,3,4-tiadiazóis têm a capacidade de modificar a ultraestrutura parasitária, conforme evidenciado pela análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (ALMUTAIRI et al., 2022). Outro estudo conduzido por Moneer e colaboradores (2023), envolvendo a análise de taquizoítos de *T. gondii* após o tratamento com compostos que possuem em sua estrutura um núcleo piridínico, revelou que a ultraestrutura da membrana sofreu deformações. Esses achados corroboram com os resultados do nosso próprio trabalho, no qual observamos modificações significativas na ultraestrutura do parasito por meio de microscopia eletrônica de transmissão, ampliando ainda mais a compreensão dos efeitos dos compostos em estudo.

Em adição, dosamos citocinas para averiguar possível modulação da resposta imune por ambos compostos. Verificou-se que tanto RVI 30 quanto RVI 33 aumentaram MIF em células BeWo. No contexto da toxoplasmose, a MIF tem sido associada a várias atividades que contribuem para a defesa do hospedeiro contra o parasita. Estudos

demonstram que animais sem MIF são altamente suscetíveis à infecção experimental por *T. gondii*, desenvolvendo patologia grave em vários órgãos (FLORES et al., 2008). Além disso, nossos estudos anteriores mostraram uma produção aumentada de MIF em trofoblastos humanos e explantes vilosos após a infecção por *T. gondii*, quando MIF foi uma estratégia importante para combater a infecção nesses modelos experimentais de interface materno-fetal humana, independentemente do tratamento com medicamentos (DA SILVA et al., 2017; GOMES et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2020; MARTÍNEZ et al., 2023).

Observamos também uma regulação negativa de IL-8 quando as células BeWo foram tratadas com RVI 30. Nosso estudo anterior mostrou níveis baixos de IL-8 em células THP-1 infectadas por *T. gondii* e inibidas pela ciclooxygenase 2 (COX-2), o que contribuiu para o controle da replicação do parasita (PEREIRA et al., 2019). Além disso, demonstramos anteriormente que as células BeWo infectadas por *T. gondii* e tratadas com oleorresina de *C. multijuga* apresentaram regulação negativa de IL-8 e isso foi importante para controlar a replicação do taquizoito (MARTÍNEZ et al., 2023). Finalmente, a P21 recombinante, uma importante proteína do *Trypanosoma cruzi*, desencadeou doses mais baixas de IL-8 em células BeWo, reduzindo a replicação do *Toxoplasma*, um estudo que simulou coinfeção na interface materno-fetal humana (DE SOUZA et al., 2023). Nesse sentido, é possível levantar a hipótese de que os baixos níveis de IL-8 nas células tratadas com RVI 30 possam ter contribuído para o controle de *T. gondii*. Acreditamos que a regulação positiva da MIF e a modulação negativa da IL-8 possam contribuir também para controlar a infecção, além do efeito direto na ultraestrutura do parasita averiguada pela microscopia eletrônica.

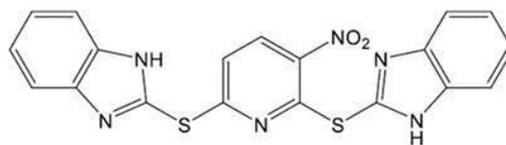
Por fim, examinamos os efeitos de ambos os compostos em explantes vilosos humanos do terceiro trimestre de gravidez. Foi detectada uma redução na proliferação intracelular de *T. gondii*, sem alterações no perfil de citocinas. Isso sugere um impacto direto dos compostos nos taquizoitos e, basicamente, nenhuma interferência na resposta imunológica dos explantes. Assim, RVI 30 e RVI 33 demonstraram ser uma estratégia alternativa excepcional para prevenir ou reduzir a transmissão vertical da toxoplasmose, mantendo o perfil imunológico essencial para uma gravidez bem-sucedida. As culturas celulares representam exemplos proeminentes em estudos *in vitro*. No entanto, os explantes placentários desempenham um papel crucial na validação dos resultados obtidos em linhagens celulares, dada sua disparidade potencial em relação ao ambiente

natural (ROSINI et al., 2022). Portanto, nossos resultados indicam que RVI 30 e RVI 33 são eficazes no controle da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas e explantes vilosos humanos.

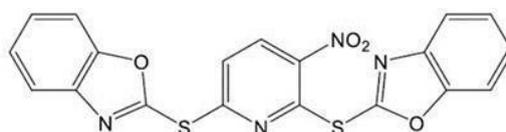
6. CONCLUSÃO

Concluimos que o presente estudo demonstrou que RVI 30 e RVI 33 podem controlar a infecção por *T. gondii*, conforme mostrado por meio de modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo*. Concluimos que os efeitos anti-*T. gondii* desencadeados por esses compostos provavelmente estão relacionados ao efeito direto sobre os parasitas, bem como à imunomodulação das células hospedeiras. Assim, nossos achados fornecem evidências de que esses compostos podem servir como uma fonte alternativa para o tratamento da toxoplasmose congênita, reduzindo a taxa de proliferação do *T. gondii* com baixos efeitos citotóxicos nas células hospedeiras.

7. FIGURAS



RVI 30



RVI 33

Figura 2. Estrutura molecular de RVI 30 e RVI 33.

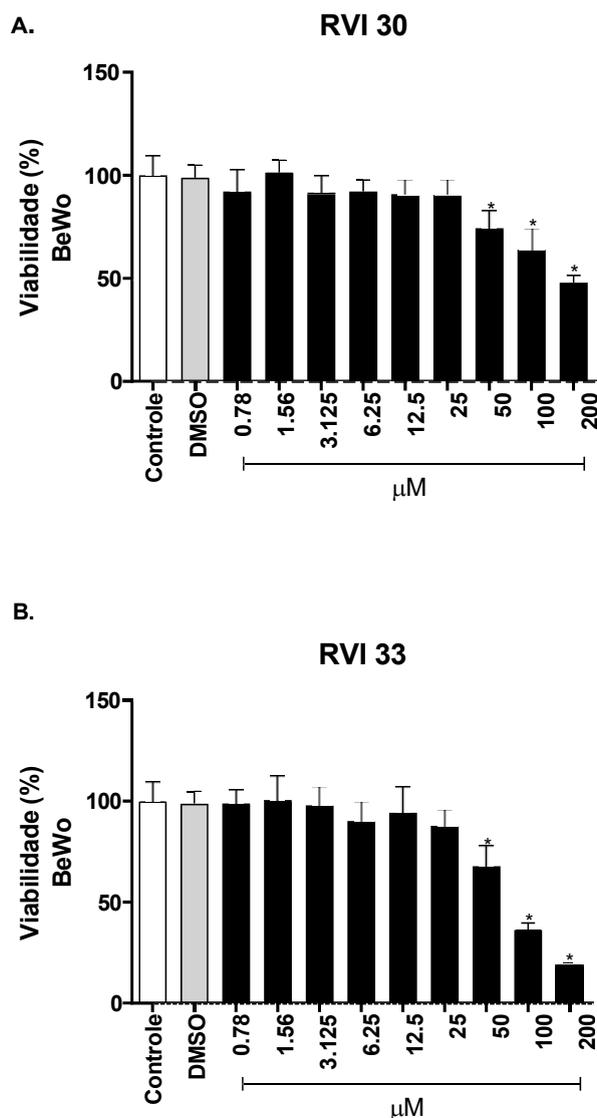


Figura 3. RVI 30 e RVI 33 reduziram a viabilidade das células BeWo apenas em altas concentrações. As células BeWo foram tratadas por 24 horas em diluições seriadas (variando de 200 a 0,78 µM) com RVI 30 (A) ou RVI 33 (B), e o ensaio MTT foi conduzido. O tratamento com meio de cultura sozinho (controle) e 0,8% de DMSO foram considerados controles negativos. A viabilidade celular foi expressa em porcentagens (% de viabilidade celular), com a absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura considerada 100% de viabilidade. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão de três experimentos realizados com oito replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *Diferenças significativas em relação ao controle ($P < 0,05$).

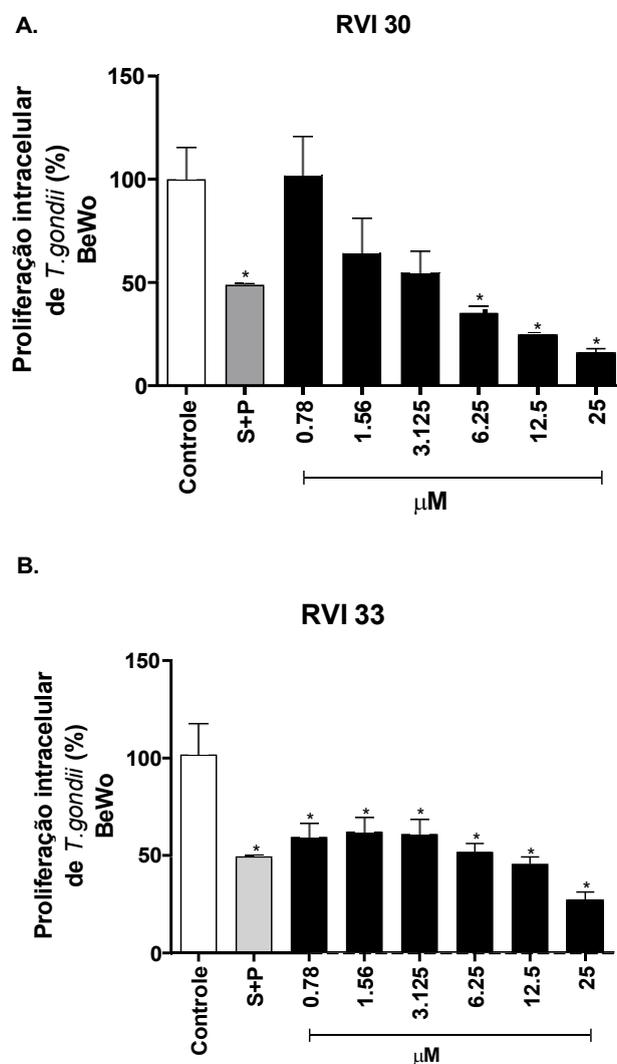


Figura 4. RVI 30 e RVI 33 foram capazes de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo. As células BeWo infectadas com *T. gondii* foram tratadas por 24 horas com concentrações não tóxicas de RVI 30 (A) ou RVI 33 (B), enquanto apenas meio de cultura (controle) ou uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina (S+P) foram considerados controles negativos e positivos, respectivamente. A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase e expressa como mudança percentual referente ao controle (controle, 100% de proliferação de *T. gondii*). Nossos resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos realizados com oito replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * Diferenças significativas em relação ao controle ($P < 0,05$).

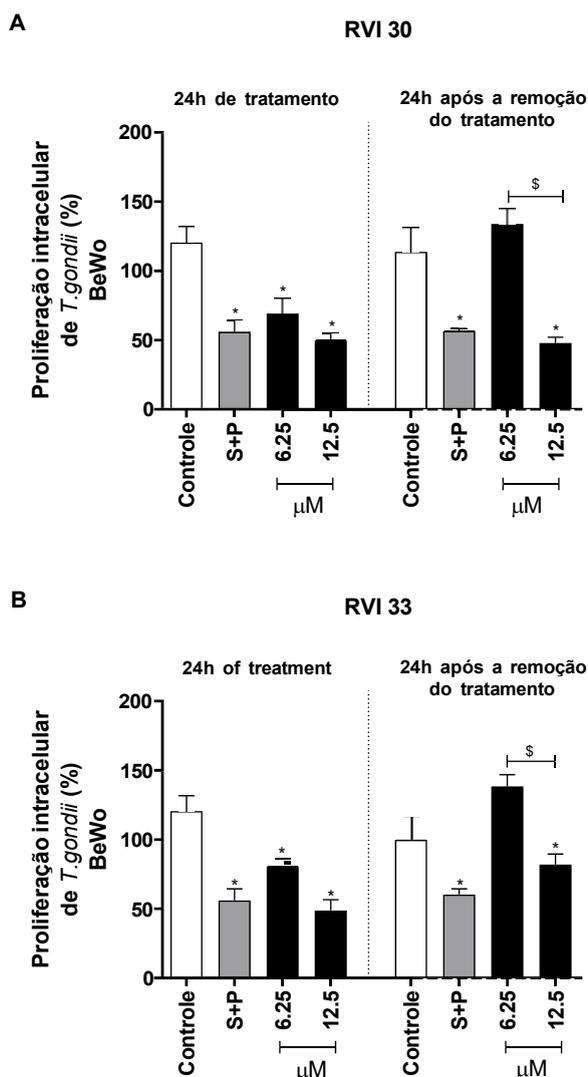


Figura 5. RVI 30 e RVI 33 demonstraram um efeito anti-*T. gondii* irreversível de maneira dependente da dose. As células BeWo infectadas foram tratadas com RVI 30 (A), RVI 33 (B) ou S+P por 24 horas, seguido da remoção do tratamento, e o crescimento do parasita foi permitido por mais 24 horas na ausência de compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem de reversibilidade do tratamento, que corresponde à capacidade do parasita de recuperar seu crescimento após o tratamento. A triagem baseada em β -galactosidase foi usada como indicador de proliferação do parasita. Nossos resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de dois experimentos realizados com seis replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao controle (*) ou entre diferentes concentrações de compostos (§), ($P < 0,05$).

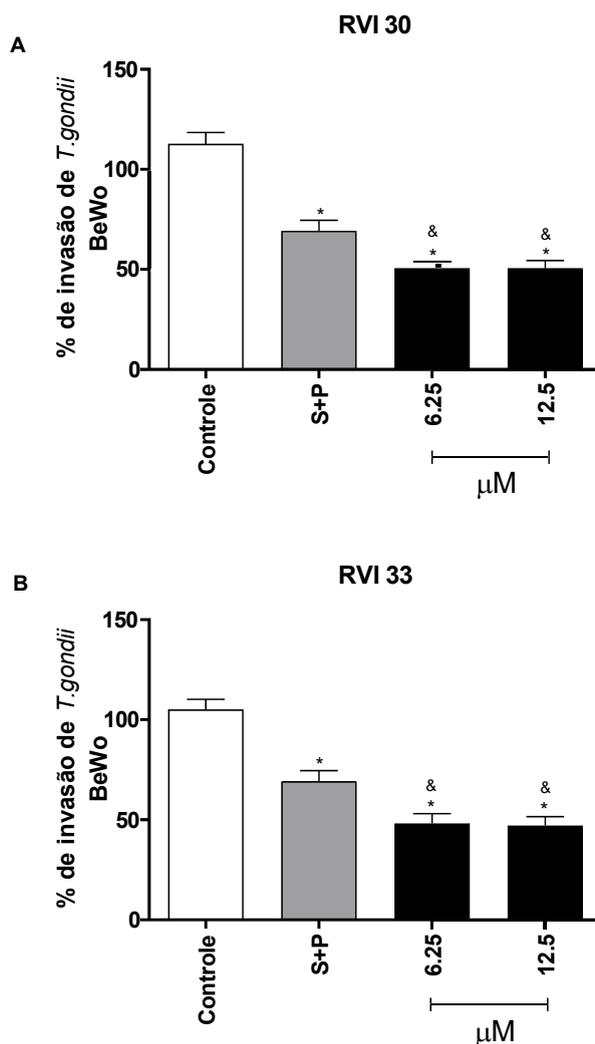


Figura 6. RVI 30 e RVI 33 apresentaram uma ação direta sobre taquizoítos de *T. gondii*. Os taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 hora com RVI 30 (A) ou RVI 33 (B), S+P ou meio de cultura sozinho (controle) e adicionados em monocamadas de células BeWo por 3 horas e a invasão de *T. gondii* (%) foi determinada usando o ensaio de β -galactosidase. Parasitas não tratados (controle) foram considerados como 100% de invasão. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos realizados com seis replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao controle (*) ou S+P (&), ($P < 0,05$).

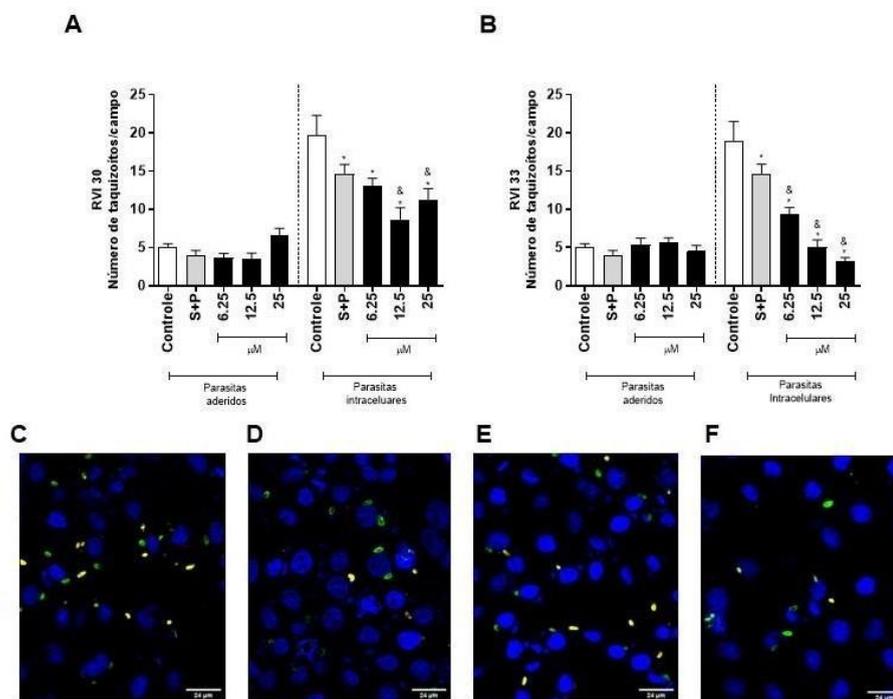


Figura 7. Células BeWo tratadas com RVI 30 ou RVI 33 demonstraram redução na invasão de *T. gondii*. As células BeWo foram pré-tratadas por 24 horas com RVI 30 (A), RVI 33 (B) ou S+P, infectadas com *T. gondii* por 3 horas e então a adesão e invasão parasitária foram avaliadas usando microscopia confocal de fluorescência. O número de taquizoítos intracelulares (verde) e aderidos (vermelho, vermelho+verde) foi determinado usando a marcação diferencial de taquizoítos de *T. gondii*. Quinze campos foram examinados aleatoriamente para contar o número de parasitas. (C-F): Imagens representativas do número de taquizoítos intracelulares (verde) em células BeWo tratadas com S+P (D), RVI 30 (12,5 µM, E) e RVI 33 (12,5 µM, F) em comparação com células não tratadas (C). O núcleo celular é marcado com TOPRO-3 (azul), taquizoítos aderidos (vermelho, vermelho + verde) marcados com Alexa Fluor 594 e taquizoítos intracelulares (verde) com Alexa Fluor 488. Barra: 20 µm. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de dois experimentos realizados com seis replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao controle (*) ou S+P (&), ($P < 0,05$).

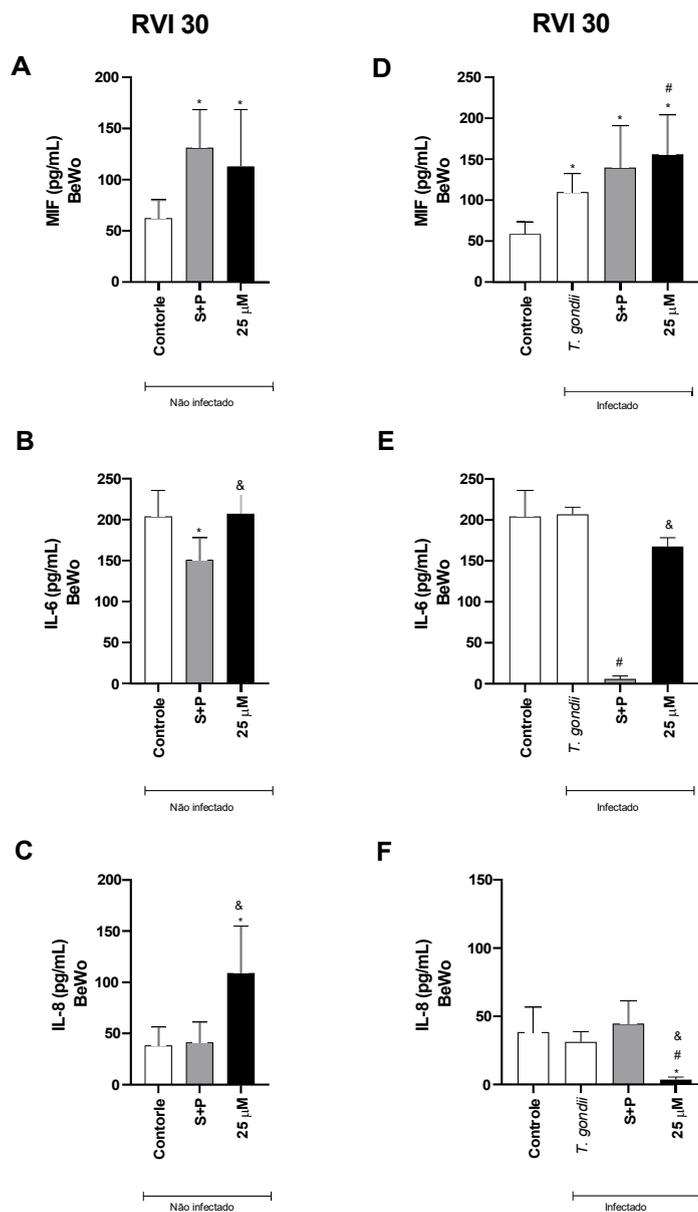


Figura 8. Células BeWo infectadas com *T. gondii* e tratadas com RVI 30 apresentaram aumento de MIF e modulação negativa de IL-8. As células BeWo foram infectadas e tratadas ou não com RVI 30 por 24 horas. Células não tratadas e não infectadas (controle), células não tratadas e infectadas (*T. gondii*) e S+P foram usados como controles. Os sobrenadantes foram coletados e usados para dosar MIF (A, D), IL-6 (B, E) e IL-8 (C, F) por ELISA. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de três experimentos realizados com oito replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Diferenças significativas em relação ao controle (*), *T. gondii* (#) ou S+P (&), ($P < 0,05$).

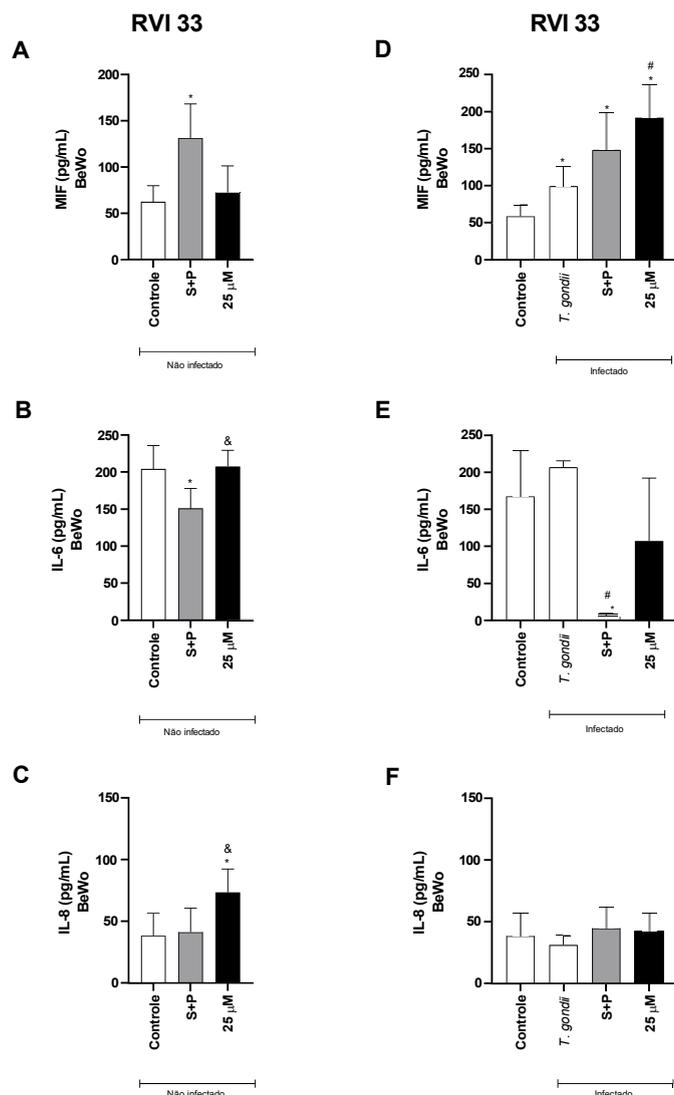


Figura 9. Células BeWo infectadas com *T. gondii* e tratadas com RVI 33 apresentaram aumento de MIF. As células BeWo foram infectadas e tratadas ou não com RVI 33 por 24 horas. Células não tratadas e não infectadas (controle), células não tratadas e infectadas (*T. gondii*) e S+P foram usados como controles. Os sobrenadantes foram coletados e usados para dosar MIF (A, D), IL-6 (B, E) e IL-8 (C, F) por ELISA. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de três experimentos realizados com oito replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Diferenças significativas em relação ao controle (*), *T. gondii* (#) ou S+P (&), ($P < 0,05$).

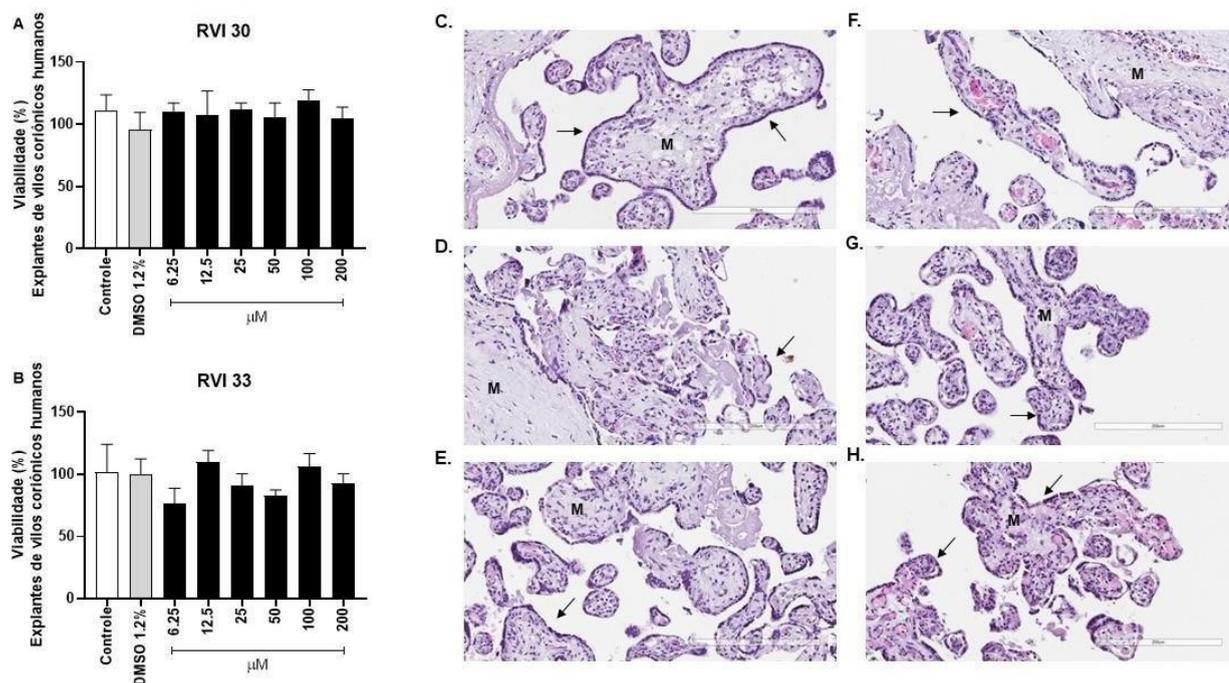


Figura 10. RVI 30 e RVI 33 não induziram nenhuma alteração na viabilidade tecidual de explantes vilosos humanos. Explantes vilosos foram tratados por 24 horas com RVI 30 (A) ou RVI 33 (B) e a viabilidade tecidual foi avaliada pelo ensaio de MTT (viabilidade em % pela incorporação de MTT). Imagens representativas de vilosidades incubadas apenas com meio de cultura (controle) (C), DMSO (D), 100 μ M de RVI 30 (E), 200 μ M de RVI 30 (F), 100 μ M de RVI 33 (G) e 200 μ M de RVI 33 (H). Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão de três experimentos realizados com oito replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Secções histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE) mostram sinciciotrofoblasto (setas pretas) e mesênquima (M). Barra: 50 μ m.

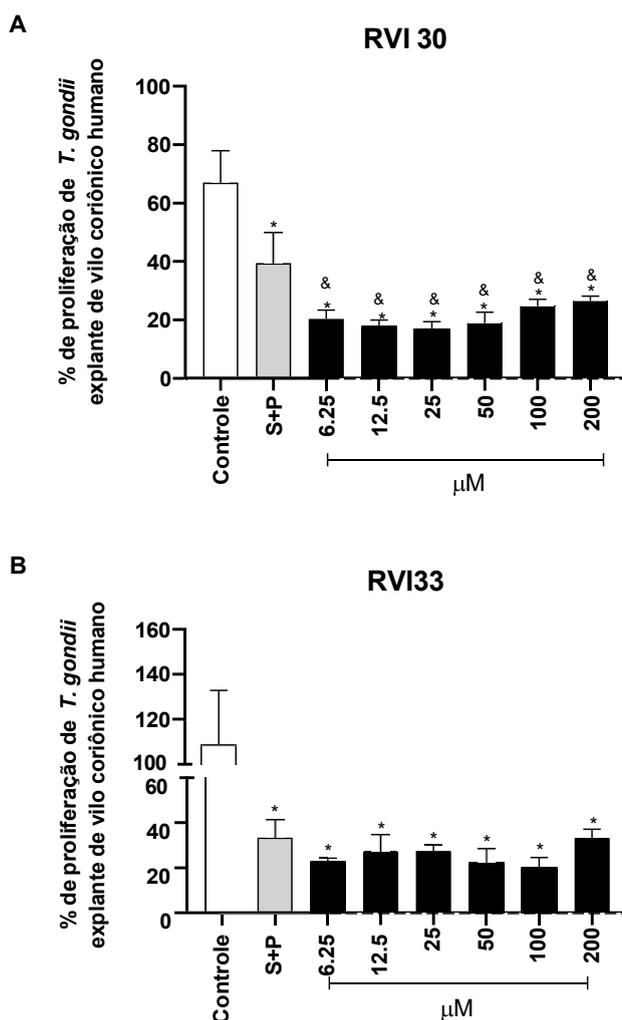


Figura 11. RVI 30 e RVI 33 reduziram significativamente a proliferação de *T. gondii* em explantes vilosos humanos. Explantes vilosos humanos foram infectados com *T. gondii* e tratados por 24 horas com RVI 30 ou RVI 33, S+P, ou apenas meio de cultura (controle). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi medida pelo ensaio de β -galactosidase, e o número de taquizoítos foi expresso como uma porcentagem (% de proliferação de *T. gondii*), sendo que o não tratado/infectado (controle) foi considerado como 100% de proliferação parasitária. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão de três experimentos realizados com oito replicatas. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao controle (*) ou S+P (&), ($P < 0,05$).

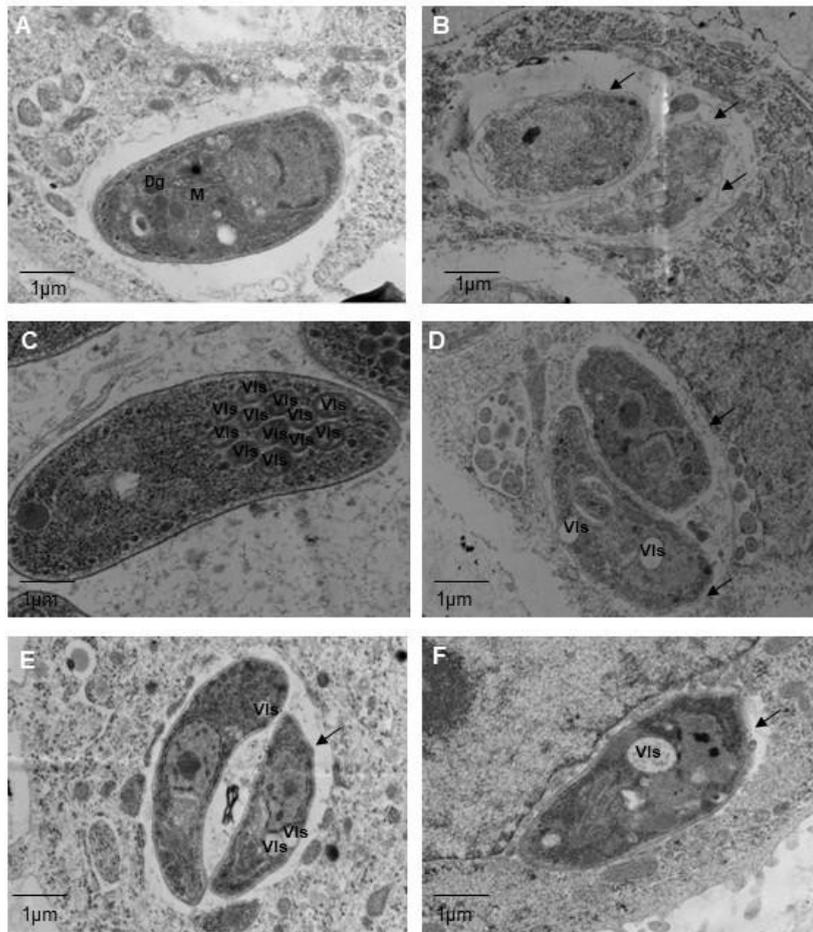


Figura 12. Ultraestrutura do parasita após exposição aos tratamentos com RVI 30 e RVI 33. Micrografias eletrônicas de transmissão de *T. gondii* intracelular após 24 h de exposição a (A) apenas meio de cultura (grupo controle), (B) S + P (200 + 8 µg/mL), 25 µM de RVI 30 (C), 12.5 µM de RVI 30 (D), 25 µM de RVI 33 (E), ou 12.5 µM de RVI 33 (F). Pv, vacúolo parasitóforo; Rp, roptrias; Vls, estrutura semelhante a um vacúolo; M, mitocôndrias; e Dg, grânulo denso de taquizoítos de *T. gondii*. Seta: membrana dupla do parasita; Escala de barras (canto inferior esquerdo): 1 µm.

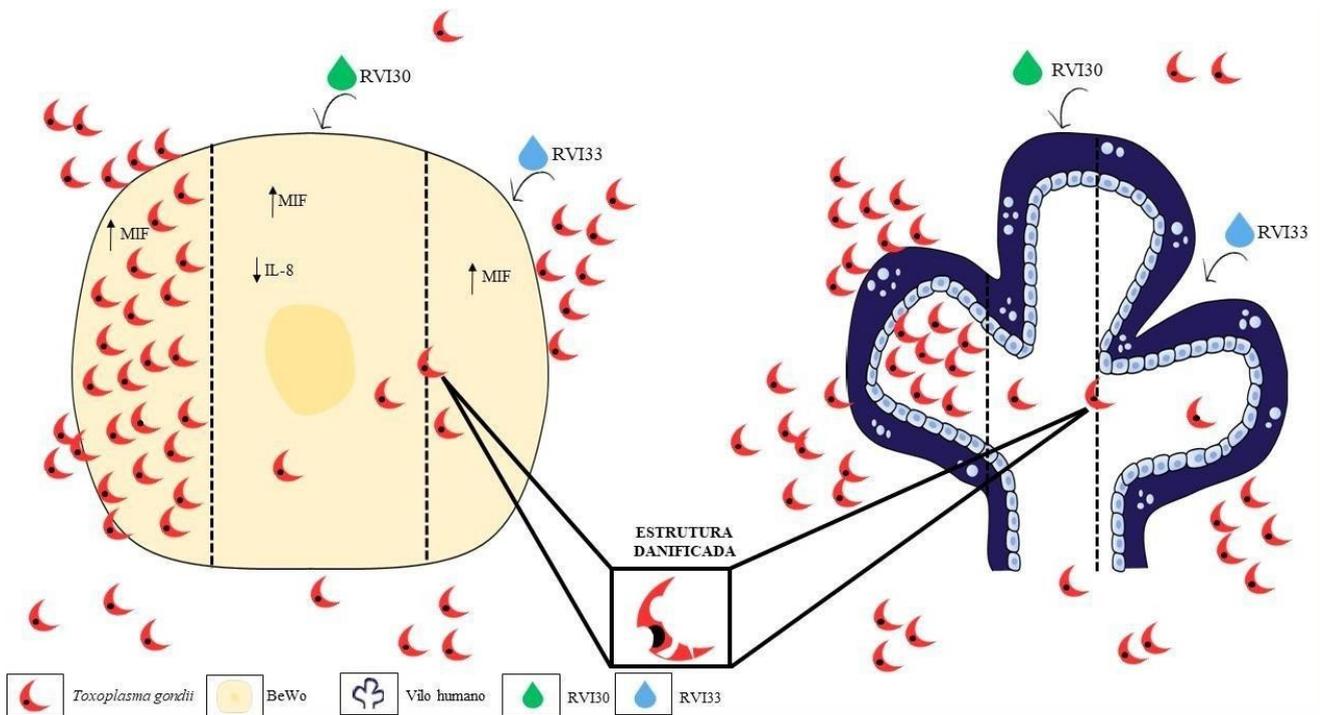


Figura 13. Esquema resumindo os efeitos de RVI 30 e RVI 33 contra a infecção por *T. gondii* em modelos da interface materno-fetal humana. Células BeWo (esquerda) tratadas com RVI 30 ou RVI 33 reduziram significativamente o crescimento de *T. gondii* por dois mecanismos diferentes: ambos os compostos desencadearam danos na estrutura do parasita e regulação positiva MIF, enquanto apenas RVI 30 modulou negativamente IL-8. Explantes vilosos humanos (direita) tratados com RVI 30 ou RVI 33 reduziram significativamente o crescimento de *T. gondii* por um mecanismo: ambos os compostos desencadearam danos na estrutura do parasita.

Referências

- ABBASI, M. et al. Infection of Placental Trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 4, p. 608–616, 15 ago. 2003.
- ALMUTAIRI, T. M. et al. Exploring the Antiparasitic Activity of Tris-1,3,4-Thiadiazoles against *Toxoplasma gondii*-Infected Mice. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2246, 30 mar. 2022.
- APLIN, J. D.; LEWIS, R. M.; JONES, C. J. P. Development of the Human Placental Villus. Em: **Reference Module in Biomedical Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2018.
- ATTIAS, M. et al. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 588, 23 dez. 2020.
- BERGER, F. et al. Toxoplasmosis among pregnant women in France: Risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. **Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique**, v. 57, n. 4, p. 241–248, ago. 2009.
- BETANCOURT-CONDE, I. et al. Benzimidazole Derivatives as New and Selective Inhibitors of Arginase from *Leishmania mexicana* with Biological Activity against Promastigotes and Amastigotes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13613, 19 dez. 2021.
- BISTROVIĆ, A. et al. Synthesis, anti-bacterial and anti-protozoal activities of amidinobenzimidazole derivatives and their interactions with DNA and RNA. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1323–1334, 1 jan. 2018.
- BOTOS, I.; SEGAL, D. M.; DAVIES, D. R. The Structural Biology of Toll-like Receptors. **Structure**, v. 19, n. 4, p. 447–459, abr. 2011.
- BOYER, K. M. et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, n. 2, p. 564–571, fev. 2005.
- CARELLOS, E. V. M. et al. Adverse Socioeconomic Conditions and Oocyst-Related Factors Are Associated with Congenital Toxoplasmosis in a Population-Based Study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88588, 11 fev. 2014.
- CASTRO, A. S. et al. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 240–247, mar. 2013.
- CHALLIS, J. R. et al. Inflammation and Pregnancy. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 2, p. 206–215, 30 fev. 2009.
- CHEN, Z. et al. Discovery of novel and potent CDK8 inhibitors for the treatment of acute myeloid leukaemia. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, 31 dez. 2024.

- CHERAGHIPOUR, K. et al. The Experimental Role of Medicinal Plants in Treatment of *Toxoplasma gondii* Infection: A Systematic Review. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 2, p. 303–328, 6 jun. 2021.
- CORVI, M. M. et al. Triclabendazole and clofazimine reduce replication and spermine uptake in vitro in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 69, 23 jan. 2024.
- DA SILVA, R. J. et al. 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*, v. 7, 26 jul. 2017.
- DE SOUZA, G. et al. Cyclooxygenase (COX)-2 modulates *Toxoplasma gondii* infection, immune response and lipid droplets formation in human trophoblast cells and villous explants. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 12709, 16 jun. 2021.
- DEGANICH, M.; BOUDREAUX, C.; BENMERZOUGA, I. Toxoplasmosis Infection during Pregnancy. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 1, p. 3, 21 dez. 2022.
- DELGADO BETANCOURT, E. et al. From Entry to Early Dissemination—*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter With Its Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 5 mar. 2019.
- DENG, Y. et al. In Vitro Anti-*Toxoplasma gondii* Activity Evaluation of a New Series of Quinazolin-4(3 H)-one Derivatives. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 12, 16 dez. 2021.
- DENKERS, E. Y. et al. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 411–421, mar. 2004.
- DENNEY, J. M. et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 170–177, fev. 2011.
- 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, 10 set. 2012.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, abr. 1998.
- DUNAY, I. R. et al. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, out. 2018.
- DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 793–813, 7 nov. 2012.

- ELGAWAD, H. A. et al. Biological evaluation of newly synthesized quinoline-based compound PPQ-8 in acute and chronic toxoplasmosis: An experimental study. **Experimental Parasitology**, v. 206, p. 107756, nov. 2019.
- ELLERY, P. M. et al. Evidence for Transcriptional Activity in the Syncytiotrophoblast of the Human Placenta. **Placenta**, v. 30, n. 4, p. 329–334, abr. 2009.
- EL-ZOGHBI, M. S. et al. Design, synthesis and mechanistic study of new dual targeting HDAC/tubulin inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 601–622, abr. 2024.
- EZZATKHAH, F.; MAHMOUDVAND, H.; RAZIANI, Y. The role of *Curcuma longa* essential oil in controlling acute toxoplasmosis by improving the immune system and reducing inflammation and oxidative stress. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 27 abr. 2023.
- FERGUSON, D. J. P. et al. Maternal Inheritance and Stage-Specific Variation of the Apicoplast in *Toxoplasma gondii* during Development in the Intermediate and Definitive Host. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 814–826, abr. 2005.
- FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133–148, mar. 2009.
- FLORES, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 10, p. 3661–3671, 7 out. 2008.
- FOROUTAN, M. et al. Rhoptry antigens as *Toxoplasma gondii* vaccine target. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 8, n. 1, p. 4, 2019.
- FOROUTAN-RAD, M. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Iranian pregnant women: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 158, p. 160–169, jun. 2016.
- FRANCESCONI, V. et al. State-of-the-art Review on the Antiparasitic Activity of Benzimidazole-based Derivatives: Facing Malaria, Leishmaniasis, and Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 31, 15 set. 2023.
- GILBERT, R. E. et al. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e277, 13 ago. 2008.
- GOMES, A. O. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Prevents Maternal Death, but Contributes to Poor Fetal Outcome During Congenital Toxoplasmosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 8 maio 2018.
- HALL, C. I. et al. Chemical genetic screen identifies *Toxoplasma* DJ-1 as a regulator of parasite secretion, attachment, and invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 26, p. 10568–10573, 28 jun. 2011.
- HALONEN, S. K.; WEISS, L. M. Toxoplasmosis. Em: [s.l: s.n.]. p. 125–145.

- HEATON, S. J. et al. The use of BeWo cells as an in vitro model for placental iron transport. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 5, p. C1445–C1453, nov. 2008.
- HERNANDEZ-DIAZ, S. Neural Tube Defects in Relation to Use of Folic Acid Antagonists during Pregnancy. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, n. 10, p. 961–968, 15 maio 2001.
- HERNANDEZ-DIAZ, S. Neural Tube Defects in Relation to Use of Folic Acid Antagonists during Pregnancy. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, n. 10, p. 961–968, 15 maio 2001.
- HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 41–61, 28 jun. 2005.
- KHAN, M. T. et al. Amino acid conjugates of 2-mercaptobenzimidazole provide better anti-inflammatory pharmacology and improved toxicity profile. **Drug Development Research**, v. 81, n. 8, p. 1057–1072, 11 dez. 2020.
- KIM, D. H. et al. *In Vitro* Activity of Benzimidazole (SPR719) Against Clinical Isolates of Nontuberculous Mycobacteria With and Without Clarithromycin or Amikacin Resistance. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 44, n. 1, p. 92–96, 1 jan. 2024.
- KNÖFLER, M. et al. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 18, p. 3479–3496, 3 set. 2019.
- KONSTANTINOVIC, N. et al. Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, p. e00036, jun. 2019.
- KUMAR, R. 5-(1-Substituted) Alkyl Pyrimidine Nucleosides as Antiviral (herpes) Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2749–2766, 1 out. 2004.
- LAPIER, M. et al. Novel [1,2,3]triazolo[1,5-a]pyridine derivatives are trypanocidal by sterol biosynthesis pathway alteration. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 1137–1155, maio 2019.
- LAWLESS, L. et al. Trophoblast Differentiation: Mechanisms and Implications for Pregnancy Complications. **Nutrients**, v. 15, n. 16, p. 3564, 12 ago. 2023.
- LIMA, T. S.; LODOEN, M. B. Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 16 abr. 2019.
- MAO, L. et al. Design, synthesis, and anti-respiratory syncytial virus potential of novel 3-(1,2,3-triazol-1-yl)furoxazine-fused benzimidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 261, p. 115799, dez. 2023.
- MARTÍNEZ, A. F. F. et al. Leaf hydroalcoholic extract and oleoresin from *Copaifera multijuga* control *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and placental explants from third-trimester pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 13 fev. 2023.

- MASCH, A. et al. Structure–activity relationships in a series of antiplasmodial thieno[2,3-b]pyridines. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 89, 21 dez. 2019.
- MATADAMAS-MARTÍNEZ, F. et al. Proteomic and ultrastructural analysis of the effect of a new nitazoxanide-N-methyl-1H-benzimidazole hybrid against *Giardia intestinalis*. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 171–179, abr. 2016.
- MELO, M. B.; JENSEN, K. D. C.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 11, p. 487–495, nov. 2011.
- MITCHELL, C. D. et al. Congenital toxoplasmosis occurring in infants perinatally infected with human immunodeficiency virus 1. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 9, n. 7, p. 512–518, jul. 1990.
- MONEER, E. A. et al. Design and synthesis of novel bis-pyridinium based-ionic liquids as potent antiparasitic agents. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e15431, abr. 2023.
- MONTAZERI, M. et al. A Systematic Review of *In vitro* and *In vivo* Activities of Anti-Toxoplasma Drugs and Compounds (2006–2016). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 20 jan. 2017.
- MONTOYA, J.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, jun. 2004.
- MOTAVALLIHAGHI, S. et al. Dimedone nanoparticle as a promising approach against toxoplasmosis: *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 166, p. 115356, out. 2023.
- NAHOULI, H. et al. Seroprevalence of Anti- *Toxoplasma gondii* Antibodies Among Lebanese Pregnant Women. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 12, p. 785–790, dez. 2017.
- NASR, I. S. AL et al. Antiparasitic Activity of Fluorophenyl-Substituted Pyrimido[1,2-a]benzimidazoles. **Biomedicines**, v. 11, n. 1, p. 219, 14 jan. 2023.
- NERES, J. et al. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 2106–2119, mar. 2007.
- NUNES DO REGO E SILVA, G. et al. Toxoplasmosis outbreak in Brazil, 2006 - Revisited. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 7, p. e00117, nov. 2019.
- OZ, H. S. Toxoplasmosis complications and novel therapeutic synergism combination of diclazuril plus atovaquone. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 15 set. 2014.
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385–1394, out. 2009.
- PAUL, E. et al. *Toxoplasma gondii* seroprevalence among pregnant women attending antenatal clinic in Northern Tanzania. **Tropical Medicine and Health**, v. 46, n. 1, p. 39, 19 dez. 2018.

- PEREIRA, A. C. A. et al. Cyclooxygenase (COX)-2 Inhibitors Reduce *Toxoplasma gondii* Infection and Upregulate the Pro-inflammatory Immune Response in *Calomys callosus* Rodents and Human Monocyte Cell Line. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 12 fev. 2019.
- PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 3, p. 908–912, fev. 1984.
- PRANGTHIP, P. et al. Anthelmintic efficacy evaluation and mechanism of N-methylbenzo[d]oxazol-2-amine. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 22840, 21 dez. 2023.
- RADWAN, M. A. A. et al. Synthesis, molecular docking and antimicrobial activity of new fused pyrimidine and pyridine derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, p. 103516, mar. 2020.
- RIBEIRO, J. L. S. et al. Trypanocidal activity of new 1,6-diphenyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 115855, jan. 2021.
- ROBBINS, J. R. et al. Tissue Barriers of the Human Placenta to Infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 1, p. 418–428, jan. 2012.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, abr. 2012.
- ROSINI, A. M. et al. LPS-mediated activation of TLR4 controls *Toxoplasma gondii* growth in human trophoblast cell (BeWo) and human villous explants in a dependent-manner of TRIF, MyD88, NF- κ B and cytokines. **Tissue and Cell**, v. 78, p. 101907, out. 2022.
- ROSTAMI, H.; HADDADI, M. H. Benzimidazole derivatives: A versatile scaffold for drug development against *Helicobacter pylori* -related diseases. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 36, n. 6, p. 930–943, 27 dez. 2022.
- SALVADOR, R. R. S. et al. New carbohydrazide derivatives of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine and trypanocidal activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 4, p. 2341–2348, 1 dez. 2016.
- SANA, M. et al. Immune response against toxoplasmosis—some recent updates RH: *Toxoplasma gondii* immune response. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 36, p. 039463202210784, 28 jan. 2022.
- SASAI, M.; YAMAMOTO, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, p. 1–10, 11 dez. 2019.
- SHER, A.; TOSH, K.; JANKOVIC, D. Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36–42, 9 jan. 2017.

- SILVA, L. A. et al. Efficacy of sulfadiazine and pyrimetamine for treatment of experimental toxoplasmosis with strains obtained from human cases of congenital disease in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 202, p. 7–14, jul. 2019.
- SMITH, N. C. et al. Control of human toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 2–3, p. 95–121, fev. 2021.
- SRIVASTAVA, R. et al. Exploring antiviral potency of N-1 substituted pyrimidines against HIV-1 and other DNA/RNA viruses: Design, synthesis, characterization, ADMET analysis, docking, molecular dynamics and biological activity. **Computational Biology and Chemistry**, v. 106, p. 107910, out. 2023.
- TAHIR, T. et al. Pyridine Scaffolds, Phenols and Derivatives of Azo Moiety: Current Therapeutic Perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4872, 11 ago. 2021.
- TAHLAN, S. et al. 2-Mercaptobenzimidazole Schiff Bases: Design, Synthesis, Antimicrobial Studies and Anticancer Activity on HCT-116 Cell Line. Mini-Reviews in **Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 1080–1092, 21 ago. 2019.
- TEIXEIRA, S. C. et al. *Copaifera spp.* oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15158, 16 set. 2020.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, nov. 2000.
- VIJAYALAXMI, K. K. & VISHALAKSHI, M. Evaluation of the genotoxic effects of pyrimethamine, an antimalarial drug, in the *in vivo* mouse. **Teratog. Carcinog. Mutagen.** 20, 65–71, jan 2000
- WANG, C. et al. 3-aryl-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyridines inhibit tubulin polymerisation and act as anticancer agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, 31 dez. 2024.
- WARSCHKAU, D.; SEEBER, F. Advances towards the complete *in vitro* life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Faculty Reviews**, v. 12, 13 fev. 2023.
- WEGLIŃSKA, L. et al. Inhibition of *Toxoplasma gondii* by 1,2,4-triazole-based compounds: marked improvement in selectivity relative to the standard therapy pyrimethamine and sulfadiazine. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 1, p. 2621–2634, 31 dez. 2022.
- WILKINSON, C. et al. The benzimidazole based drugs show good activity against *T. gondii* but poor activity against its proposed enoyl reductase enzyme target. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 3, p. 911–916, fev. 2014.
- WUJCICKA, W.; WILCZYŃSKI, J.; NOWAKOWSKA, D. Do the placental barrier, parasite genotype and Toll-like receptor polymorphisms contribute to the course of primary infection with various *Toxoplasma gondii* genotypes in pregnant women? **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 703–709, 30 maio 2014.

YAMANOI, Y. Recent Progress on the Synthesis of Bipyridine Derivatives. **Molecules**, v. 29, n. 3, p. 576, 24 jan. 2024.

YANG, X. et al. The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 132, 21 dez. 2022.

ZHANG, Z.; OHTO, U.; SHIMIZU, T. Toward a structural understanding of nucleic acid-sensing Toll-like receptors in the innate immune system. **FEBS Letters**, v. 591, n. 20, p. 3167–3181, 21 out. 2017.

ZHOU, S.; CHEN, G.; HUANG, G. Design, synthesis and biological evaluation of imidazo[1,2-a]pyridine analogues or derivatives as anti-helminthic drug. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 4, p. 503–510, 25 abr. 2019.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE

UBERLÂNDIA/MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS FRENTE A INFECÇÃO POR PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CONGÊNITA**Pesquisador:** Bellisa de Freitas Barbosa**Área Temática:****Versão:** 2**CAAE:** 65377222.9.0000.5152**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 5.812.532**Apresentação do Projeto:**

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas dos documentos Informações Básicas da Pesquisa arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2051972.pdf" e Projeto Detalhado (Projeto_de_Pesquisa_Detalhado.pdf), postados em 18/11/2022.

INTRODUÇÃO

Neste estudo, serão coletadas placentas de gestantes com idade acima de 18 anos e idade gestacional entre 36 e 40 semanas, sorologicamente saudáveis que não apresentarem hipertensão coriônica, doenças infecciosas incluindo toxoplasmose, doença de Chagas, Leishmaniose, malária, doenças virais, doenças cardíacas, Diabetes Mellitus, Doença renal crônica e outras manifestações clínicas que possam interferir nos resultados, atendidas no setor de obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e que durante o período de desenvolvimento da pesquisa venham a realizar seus partos por cesariana. As placentas serão coletadas apenas de gestantes que voluntariamente aceitarem a participar da pesquisa, sendo comprovada pela assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Em caso de aceite da gestante, a placenta será encaminhada para o Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, onde será processada para a realização dos experimentos.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica**Bairro:** Santa Mônica**CEP:** 38.408-144**UF:** MG**Município:** UBERLÂNDIA**Telefone:** (34)3239-4131**Fax:** (34)3239-4131**E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

METODOLOGIA

Inicialmente, avaliaremos se os compostos naturais e sintéticos serão tóxicos para os explantes vilosos através do ensaio de LDH, MTT e análise morfológica. Determinada as concentrações não tóxicas, avaliaremos se esses compostos serão capazes de controlar a infecção pelos diferentes patógenos nos explantes vilosos pelo ensaio de qPCR. Em adição, iremos analisar a produção de citocinas próinflamatórias e anti-inflamatórias, bem como a produção de nitrito nos sobrenadantes das diferentes condições pelo ensaio de ELISA e Griess, respectivamente.

Metodologia de Análise de Dados:

A análise estatística será realizada usando o GraphPad Prism Software versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados serão expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças entre os grupos serão avaliadas pelo teste One- Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni para os dados paramétricos ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn para dados não paramétricos. As diferenças estatísticas serão consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Número amostral: 180 participantes.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO - As placentas serão coletadas apenas de gestantes entre 18 a 45 anos de idade que não apresentarem hipertensão coriônica, doenças infecciosas (p.ex., toxoplasmose, doença de Chagas, Leishmaniose, malária, ou doenças virais), doenças cardíacas, Diabetes Mellitus, Doença renal crônica e outras manifestações clínicas que possam interferir nos resultados. Além disso, o cartão da gestante será consultado para obtenção dos dados clínicos/sorológicos que serão utilizados na análise dos dados. Neste estudo só serão incluídas as gestantes voluntárias que assinarem o TCLE.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO - Em adição, serão excluídas do projeto placentas de gestantes menor de 18 anos e acima de 45 anos, bem como aquelas que apresentem alguma manifestação clínica que possa interferir nesse estudo. Além disso, as gestantes que não aceitarem participar da pesquisa e não assinarem o TCLE serão excluídas.

ORÇAMENTO (entidades de fomento): R\$ 70.410,00.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

CRONOGRAMA de execução: 18/02/2023 a 18/02/2033.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO - Avaliar a ação de compostos naturais e sintéticos no controle da infecção experimental por diferentes patógenos de importância congênita em explantes vilosos humanos de terceiro trimestre gestacional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS - Os riscos consistem em a utilização de placentas humanas de terceiro trimestre gestacional neste estudo não oferecerão risco à saúde da paciente, médicos, enfermeiros e ao pesquisador que irão manuseá-las, uma vez que a placenta humana normalmente é expulsa pelo organismo materno após o parto. Toda a equipe hospitalar que realizará o parto da gestante faz uso de técnicas de biossegurança, e também o pesquisador que irá manipular a placenta no laboratório fará uso de equipamentos e vestimentas de segurança, como jaleco, luvas, máscara, óculos e fluxo laminar. Portanto, nenhum risco à saúde haverá para os participantes do projeto, equipe hospitalar e a paciente. No entanto, sempre há um risco mínimo de identificação dos participantes da pesquisa, ou seja, as pacientes parturientes. Este risco mínimo de identificação pessoal será claramente descrito no TCLE, embora a identidade das pacientes será preservada. A equipe executora se compromete com o sigilo absoluto da sua identidade, pois os dados publicados serão referentes ao processo de transmissão de patógenos da mãe para o bebê pela placenta durante a gestação.

BENEFÍCIOS - Os benefícios da presente proposta são importantes tanto para a ciência quanto para as gestantes, pois os resultados obtidos a partir do desenvolvimento deste projeto podem possibilitar contribuições científicas e tecnológicas para o estabelecimento de estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento de diversas patologias, reduzindo as taxas de transmissão vertical de parasitos e vírus e, conseqüentemente, as complicações pós-natal. O estabelecimento de possíveis alvos moleculares envolvidos em etapas essenciais à perpetuação da infecção pode levar ao design de drogas alternativas para o tratamento dessa doença, o que poderá auxiliar as gestantes positivas, aumentando o leque de opções de tratamento.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências listadas no Parecer Consubstanciado nº 5.804.008, de 08 de dezembro de 2022 seguem abaixo, bem como a resposta da equipe de pesquisa e a análise de atendimento ou não da pendência feita pelo CEP/UFU.

Pendência 1 - Relacionada à metodologia:

Não ficou claro como os pesquisadores chegaram ao número amostral de 180 participantes. O CEP/UFU aponta que deve ser incluído um cálculo amostral ou citação bibliográfica que embase o número amostral. O CEP/UFU solicita adequação. As alterações deverão ser realizadas tanto no Formulário Plataforma Brasil quanto no Projeto Detalhado.”

RESPOSTA - "A justificativa para o tamanho da amostra proposta para esse estudo foi inserida na Plataforma Brasil no tópico "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador", bem como no tópico "13. Justificativa para o número de placentas a serem coletadas" do projeto de pesquisa detalhado (páginas 35-36), destacado em vermelho.

O presente projeto tem como objetivo principal avaliar a ação de compostos naturais e sintéticos no controle da infecção experimental por diferentes patógenos de importância congênita em explantes vilosos humanos de terceiro trimestre gestacional. Para isso, placentas humanas de terceiro trimestre gestacional serão adquiridas de gestantes após parto cesariano (36 a 40 semanas) no Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU). Após a coleta, as placentas serão levadas para o Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução (Instituto de Ciências Biomédicas, UFU) e então dissecadas para a coleta dos explantes vilosos e posterior realização dos experimentos. Como descrito no projeto, os experimentos a serem realizados com placenta serão: (i) análise da viabilidade de explantes vilosos humanos; (ii) análise da carga parasitária e viral por qPCR e (iii) análise de citocinas e nitrito. Visto que esse é o primeiro estudo que busca avaliar a atividade de diferentes compostos naturais e sintéticos para o tratamento de doenças no contexto da infecção vertical em placentas humanas, serão necessários experimentos prévios para a padronização da concentração dos compostos a serem utilizados, número de parasitos e vírus para infecção, além da padronização das técnicas de qPCR. Em adição, visto que os indivíduos são geneticamente diferentes entre si, se faz necessário a coleta de placentas de diferentes gestantes para maior confiabilidade dos resultados que serão obtidos. Como pode ser observado na literatura científica

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

da área, a escolha da quantidade de placentas coletadas varia entre os diferentes trabalhos, tomando como base as peculiaridades dos objetivos de cada projeto. Por exemplo, são observados estudos que utilizam um “n” amostral de 6 (Franco et al., 2019), 10 (Medina et al., 2022), 25 (Mezzano et al., 2022) e até mesmo 120 (Cao et al., 2022) placentas.

Diante disso e baseado nas referências supracitadas, propomos no presente projeto que a coleta de 180 (cento e oitenta) placentas, respeitando todos as diretrizes do CEP e seguindo condutas pré-estabelecidas no TCLE, seja uma quantidade ponderada e suficiente para realização de todos os ensaios propostos. Nós propomos que para cada patógeno que será estudado nesse trabalho (9 patógenos), cerca de 20 placentas sejam coletadas para avaliar a ação de diferentes compostos naturais e sintéticos, como descrito no projeto detalhado, o que justifica o “n” amostral de 180 placentas que serão coletadas durante os 10 anos de execução previstos para esse projeto.”

ANÁLISE DO CEP/UFU - Pendência atendida.

=====

Pendência 2 - Relacionada ao currículo dos assistentes de pesquisa:

Não foram incluídos os currículos dos assistentes de pesquisa ou links para consulta. O CEP/UFU solicita adequação.

RESPOSTA - As alterações foram feitas no documento “Currículo Lattes da Equipe Executora”, sendo adicionados os nomes dos assistentes de pesquisa com seus respectivos links para acesso ao currículo lattes, bem como no projeto de pesquisa detalhado no tópico “10. Detalhamento das atividades de cada membro da equipe”, todas destacadas em vermelho.

ANÁLISE DO CEP/UFU - Pendência atendida.

=====

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco “1A”, sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

Pendência 3 - Relacionada ao Termo de Compromisso e Confidencialidade da Equipe Executora:

Os assistentes Luana Carvalho Luz, Guilherme de Souza e Samuel Cota Teixeira não assinaram o termo. O CEP/UFU solicita adequação.

RESPOSTA - As alterações foram feitas no "Termo de Compromisso da Equipe Executora", sendo adicionados os nomes dos assistentes de pesquisas com suas respectivas assinaturas, destacados em vermelho.

ANÁLISE DO CEP/UFU - Pendência atendida.

=====
Pendência 4 - Relacionada à Declaração da Instituição Coparticipante:

A Declaração da Instituição Coparticipante HC-UFU deverá ser assinada pela Gerência de Ensino e Pesquisa do HC-UFU (Ebserh). O CEP/UFU solicita a apresentação de novo documento.

RESPOSTA - A Declaração da Instituição Coparticipante assinada pela Gerência de Ensino e Pesquisa do HC-UFU (Ebserh) foi adicionada na Plataforma Brasil.

ANÁLISE DO CEP/UFU - Pendência atendida.

=====
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados de forma adequada e com as devidas alterações conforme atendimento das pendências.

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no Parecer Consubstanciado nº 5.804.008, de 08 de dezembro de 2022 foram atendidas. Portanto, nessa versão o CEP/UFU não encontrou nenhum óbice ético.

De acordo com as atribuições definidas nas Resoluções CNS nº 466/12, CNS nº 510/16 e suas complementares, o CEP/UFU manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa.

Prazo para a entrega dos Relatórios Parciais ao CEP/UFU: MARÇO/2024, SETEMBRO/2024, MARÇO/2025, SETEMBRO/2025, MARÇO/2026, SETEMBRO/2026, MARÇO/2027, SETEMBRO/2027, MARÇO/2028, SETEMBRO/2028, MARÇO/2029, SETEMBRO/2029, MARÇO/2030, SETEMBRO/2030, MARÇO/2031, SETEMBRO/2031, MARÇO/2032, SETEMBRO/2032.

Prazo para a entrega do Relatório Final ao CEP/UFU: MARÇO/2033*.

* Tolerância máxima de 01 mês para o atraso na entrega do relatório final.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DE PESQUISA DEVE SER INFORMADA, IMEDIATAMENTE, AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE ÉTICA.

O CEP/UFU alerta que:

- a) Segundo as Resoluções CNS nº 466/12 e nº 510/16, o pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- b) O CEP/UFU poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto;
- c) A aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento às Resoluções CNS nº 466/12 e nº 510/16 e suas complementares, não implicando na qualidade

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

científica da pesquisa.

ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR:

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização e sem prejuízo (Resoluções CNS nº 466/12 e nº 510/16) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado pelo CEP/UFU e descontinuar o estudo após a análise, pelo CEP que aprovou o protocolo (Resolução CNS nº 466/12), das razões e dos motivos para a descontinuidade, aguardando a emissão do parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Resolução CNS nº 466/12). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro); e enviar a notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentando o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, destacando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. No caso de projetos do Grupo I ou II, apresentados à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador também deve informá-la, enviando o parecer aprobatório do CEP, para ser anexado ao protocolo inicial (Resolução nº 251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 5.812.532

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2051972.pdf	12/12/2022 22:32:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Detalhado.pdf	12/12/2022 22:31:18	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Outros	Pendencias_documentais_Plataforma_Brasil.docx	12/12/2022 22:28:49	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_da_Equipe_Executora.docx	12/12/2022 22:27:07	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Equipe_Executora.pdf	12/12/2022 22:25:11	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Instituicao_Coparticipante.pdf	12/12/2022 22:24:41	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Outros	Intrumento_de_Coleta_de_Dados.docx	18/11/2022 13:05:47	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido.docx	18/11/2022 13:01:51	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	18/11/2022 13:00:54	Bellisa de Freitas Barbosa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 13 de Dezembro de 2022

Assinado por:
ALEANDRA DA SILVA FIGUEIRA SAMPAIO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br