

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL APLICADAS

**ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE CHALCONAS INIBEM A INFECÇÃO
POR *Toxoplasma gondii* EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS
E EXPLANTES VILOSOS**

MARINA PASCHOALINO

UBERLÂNDIA-MG

2024

**ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE CHALCONAS INIBEM A INFECÇÃO POR
Toxoplasma gondii EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS E EXPLANTES
VILOSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Profa. Dra. Bellisa Freitas Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. Samuel Cota Teixeira

UBERLÂNDIA-MG

2024

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

P279 2024	Paschoalino, Marina, 1999- Análogos Sintéticos de Chalconas Inibem a Infecção por Toxoplasma gondii em Células Trofoblásticas Humanas e Explantos Vilosos [recurso eletrônico] / Marina Paschoalino. - 2024. Orientadora: Bellisa de Freitas Barbosa. Coorientador: Samuel Cota Teixeira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.557 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Citologia. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-, (Orient.). II. Teixeira, Samuel Cota, 1993-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título. CDU: 576.3
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas
Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 01/2024, do PPGBC				
Data:	26 de Julho de 2024	Hora de início:	13:45	Hora de encerramento:	16:15
Matrícula do Discente:	12222BCE001				
Nome do Discente:	Marina Paschoalino				
Título do Trabalho:	Análogos sintéticos de chalconas inibem a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas e explantes vilosos				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia Celular de doenças infecciosas e degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Uso de produtos naturais e compostos sintéticos como potenciais drogas contra <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>				

Reuniu-se na sala 2B213, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas/PPGBC, assim composta: Professores Doutores: **Luis Octavio Regasini** - UNESP; **Caroline Martins Mota** – UFU; e **Bellisa de Freitas Barbosa** orientadora da candidata.

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

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. 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 Mestre.

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 26/07/2024, às 16:18, 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 **Caroline Martins Mota, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/07/2024, às 16:18, 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 **Luis Octavio Regasini, Usuário Externo**, em 26/07/2024, às 16:18, 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 **5547464** e o código CRC **508C4AAB**.

Dedico este trabalho à minha mãe,
Sueli, e ao meu pai, Marcelo, que me
deram a vida e o prazer de viver ao lado
deles. Além de tudo, me presentearam com
o maior presente que eu poderia ter
recebido, o meu irmão Eduardo. Meu amor
por vocês não cabe no peito!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Bellisa, pela oportunidade de integrar o Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução. Desde nossa primeira conversa, percebi sua leveza e tranquilidade ao lidar com tudo. Com o tempo, essas qualidades se tornaram ainda mais evidentes, e minha admiração cresceu pela maneira como você acolhe e incentiva seus alunos.

Gostaria também de agradecer ao meu coorientador, Samuel, pelo apoio, paciência e por todos os ensinamentos ao longo desta jornada. Você é uma pessoa iluminada, com o dom de transmitir conhecimento e bondade através das palavras. Sua orientação foi muito importante para o meu desenvolvimento.

Não poderia deixar de agradecer à todos os integrantes do laboratório, aos que ainda estão e aos que já passaram. Agradeço à Alessandra, que foi a primeira a me acolher e me ensinar, à parceria da Luana, uma das pessoas com quem mais compartilhei perrengues e vitórias, ao Daniel, que de coorientando passou para um amigo, à amizade da Izadora, ao Guilherme de Souza, por toda a ajuda e apoio. Meu reconhecimento se estende também a Clara, Joed, Guilherme Faria, Natalia, Rafael, Matheus e Marcos. Essa experiência não teria sido nada se não fosse pela presença de todos vocês no processo. Tenho certeza que vou levar um pouquinho de todos vocês por toda a vida!

Também agradeço à minha amiga Shiraz, por sua amizade sincera e parceria ao longo desses sete anos de caminhada juntas. Te admiro e tenho certeza de que essa amizade se estenderá por muitos e muitos anos!

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, cujo constante incentivo e apoio têm sido fundamentais. Agradeço de coração ao meu irmão, Eduardo, cuja amizade é inestimável; à minha avó, Maria Augusta, que com tanto amor e carinho, cuidou, e ainda cuida de mim durante todo esse tempo; e ao meu namorado, Stefano, que ao longo de anos têm sido a minha dose diária de alegria e conforto. Vocês são minha maior fonte de força e motivação e serei eternamente grata por ter vocês na minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Eloísa, por ter me aberto as portas de seu laboratório.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, palco de muito crescimento pessoal e acadêmico, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Aplicadas que contribuíram para o meu desenvolvimento e aos membros da minha banca de qualificação e de defesa, que me auxiliaram a aprimorar o meu trabalho.

Agradeço ainda ao Laboratório de Imunopatologia da Professora Neide, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Um agradecimento especial à Iasmin e Anna Laura, por sempre estarem dispostas a ajudar, e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto.

Agradeço ao Professor Luís Octávio Regasini e seu aluno Vilson Serafim pelo fornecimento dos compostos utilizados no trabalho.

Por fim, agradeço às instituições de fomento que viabilizam a pesquisa no Brasil e, especialmente à FAPEMIG, pela concessão da bolsa que tornou possível este mestrado.

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Esta é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

RESUMO

A toxoplasmose congênita, considerada um problema de saúde pública mundial, é ocasionada pela passagem transplacentária do parasito intracelular obrigatório oportunista *Toxoplasma gondii*. A transmissão vertical deste protozoário pode levar a complicações graves para o embrião/feto, incluindo abortos espontâneos, natimortos, restrição de crescimento, malformações, danos neurológicos, encefalite, coriorretinite e calcificações cerebrais. Uma vez confirmada, o tratamento padrão para a toxoplasmose congênita após 18 semanas ou mais de gestação, se baseia na associação de sulfadiazina com pirimetamina. No entanto, estes medicamentos têm sido associados a efeitos colaterais graves, alta toxicidade e ao desenvolvimento de parasitas resistentes, destacando a necessidade urgente de terapêuticas alternativas com menos toxicidade para mãe e filho. O presente estudo demonstrou que análogos sintéticos de chalconas, compostos pertencentes à família dos flavonoides (nomeados aqui como C2, C4 e C9), foram capazes de controlar a infecção de *T. gondii* tanto em células trofoblásticas humanas (BeWo) quanto em explantes placentários humanos de terceiro trimestre gestacional. Doses não citotóxicas de C2, C4 e C9 prejudicaram irreversivelmente a invasão e subsequente proliferação intracelular do parasito em células BeWo. As microscopias eletrônicas de varredura e transmissão evidenciaram o efeito direto das chalconas sobre os taquizoítos, que apresentaram superfície rugosa irregular, membrana com estruturas semelhantes a buracos, torção e alterações substanciais em seu formato após o pré-tratamento. Além disso, C4 e, especialmente, C9 causaram danos ultraestruturais notáveis pela formação de estruturas semelhantes a vacúolos no citoplasma dos parasitos e ao redor do vacúolo parasitóforo. As chalconas também modularam o perfil de citocinas, aumentando os níveis de IL-8 e diminuindo a produção de EROs em células BeWo e regulando positivamente a liberação de TNF- α em explantes vilosos. Nossas descobertas revelaram o potencial de C2, C4 e C9 como tratamentos alternativos para toxoplasmose congênita, bem como as chalconas como uma estrutura promissora para o projeto de novas moléculas com atividade anti-*T. gondii*.

Palavras-chave: trofoblasto, placenta, *Toxoplasma gondii*, tratamento, flavonóides, chalconas.

ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis is an important public health problem worldwide caused by the transplacental passage of opportunistic protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. The vertical transmission can lead to severe complications to embryo/fetus including miscarriages, stillbirth, growth restriction, malformations, neurological damage, encephalitis, chorioretinitis and brain calcifications. Once confirmed, the standard treatment consists in an association of sulfadiazine with pyrimethamine. However, these drugs have been linked to serious side effects, high toxicity and the development of drug-resistant parasites, highlighting the urgent necessity for alternative therapeutics with less toxicity for mother and child. The current study showed that synthetic analogues of chalcones, compounds belonging to the flavonoid family, were capable to control the infection of *T. gondii* in both human trophoblast cells (BeWo) and placental human explants. Non-cytotoxic doses of C2, C4 and C9 impaired invasion and subsequent intracellular proliferation of parasite with an irreversible manner in BeWo cells. Scanning and transmission electron microscopies evidenced the direct effect of chalcones on tachyzoites, which presented irregular rough surface, membrane with hole-like structures, torsion and shape substantial changes after pretreatment. Also, C4 and, especially, C9 caused notable ultrastructural damages by the formation of vacuole-like structures in parasites cytoplasm and surrounding the parasitophorous vacuole. In addition, chalcones modulated cytokines profile, increasing IL-8 and downmodulating ROS in BeWo cells and upregulating TNF- α release in villous explants. Our findings revealed the potential of C2, C4 and C9 as alternative treatments for congenital toxoplasmosis as well as chalcones as a promising scaffold for new anti-*T. gondii* molecules design.

Key-words: trophoblast, placenta, *Toxoplasma gondii*, treatment, flavonoid, chalcones

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da composição celular das vilosidades da placenta humana. ..	10
Figura 2: Representação esquemática do ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	14
Figura 3: Estruturas químicas de chalcona e derivados.....	41
Figura 4: Ensaios de viabilidade celular e proliferação intracelular de <i>T. gondii</i>	42
Figura 5: Ensaio de reversibilidade.....	43
Figura 6: Análises ultraestruturais de <i>T. gondii</i> na presença de chalconas.....	44
Figura 7: Adesão de parasitos pré-tratados com chalconas.....	45
Figura 8: Parasitos pré-tratados com chalconas.....	46
Figura 9: Produção de EROs e citocinas em células BeWo tratadas com chalconas	47
Figura 10: Ensaios de viabilidade tecidual em explantes de vilosidades coriônicas humanas tratados com chalconas.....	48
Figura 11: Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> e produção de citocinas em explantes de vilosidades humanas tratadas com chalconas	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de CC ₅₀ , IC ₅₀ e SI.	43
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 PLACENTA: COMPOSIÇÃO E RESPOSTA IMUNE	10
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i> : ASPECTOS GERAIS, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CICLO BIOLÓGICO.....	11
1.3 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i>	15
1.4 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	15
1.5 TRATAMENTO	16
1.6 CHALCONAS	17
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	19
4.1.1 CULTURA CELULAR E MANUTENÇÃO DE <i>T. gondii</i>	19
4.1.2 CHALCONAS	19
4.1.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	20
4.1.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE <i>T. gondii</i>	20
4.1.5 ENSAIO DE REVERSIBILIDADE	21
4.1.8 ENSAIO DE ADESÃO.....	22
4.1.7 ENSAIOS DE INVASÃO E PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE TAQUIZOÍTOS DE <i>T. gondii</i> PRÉ-TRATADOS COM CHALCONAS.....	23
4.1.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	23
4.1.9 DOSAGEM INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	24
4.2 ANÁLISES <i>EX VIVO</i>	25
4.2.1 CULTURA DE EXPLANTES VILOSOS DE PLACENTAS HUMANAS	25
4.2.2 ENSAIO DE VIABILIDADE DE EXPLANTES VILOSOS HUMANOS	26
4.2.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE <i>T. gondii</i> EM EXPLANTES VILOSOS HUMANOS	27
4.3 DOSAGEM DE CITOCINAS	28
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
6. RESULTADOS	28
6.1 BAIXAS DOSES DE CHALCONAS REDUZIRAM A PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE <i>T. gondii</i> EM CÉLULAS BEWO	28

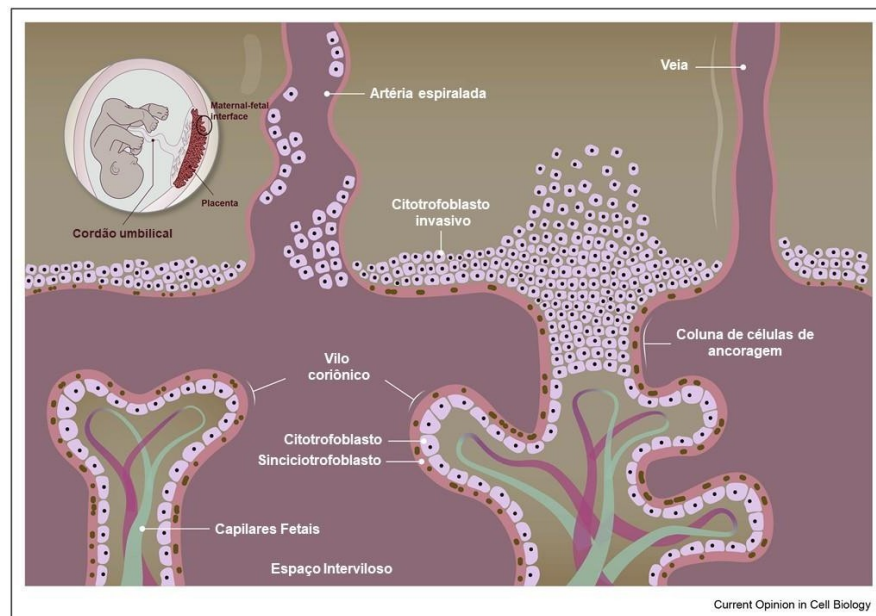
6.2	O EFEITO ANTIPROLIFERATIVO MEDIADO PELAS CHALCONAS SOBRE <i>T. gondii</i> É IRREVERSÍVEL	29
6.3	CHALCONAS INDUZIRAM DANOS ULTRAESTRUTURAIS NO PARASITO	30
6.4	O PRÉ-TRATAMENTO COM CHALCONAS PREJUDICOU A ADESÃO DOS TAQUIZOÍTOS DE <i>T. gondii</i> ÀS CÉLULAS BEWO	30
6.5	PARASITOS PRÉ-TRATADOS COM CHALCONAS APRESENTARAM TAXAS DE INVASÃO E PROLIFERAÇÃO COMPROMETIDAS, BEM COMO DANOS SUPERFICIAIS .	31
6.6	CHALCONAS MODULARAM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E EROs EM CÉLULAS BEWO32	
6.7	AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE CHALCONAS NÃO FORAM CAPAZES DE INDUZIR TOXICIDADE EM EXPLANTES DE VILOSIDADES HUMANAS.....	33
6.8	CHALCONAS REDUZIRAM A PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE <i>T. gondii</i> E MODULARAM OS NÍVEIS DE TNF-A EM EXPLANTES DE VILOSIDADES HUMANAS	34
7.	DISCUSSÃO	35
8.	CONCLUSÃO	40
9.	FIGURAS	41
10.	REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLACENTA: COMPOSIÇÃO E RESPOSTA IMUNE

A placenta é um órgão transitório responsável, principalmente, pela comunicação materno-fetal durante a gravidez (Horii *et al.*, 2020). Essa comunicação ocorre principalmente através das vilosidades coriônicas, as quais ancoram a placenta no local de implantação uterina e são essenciais para a troca de gases, nutrientes e produtos de excreção entre feto e mãe, além da síntese e secreção de hormônios e citocinas importantes para os mecanismos de modulação imunológica (Burton e Fowden, 2015; Turco e Moffett, 2019). As vilosidades coriônicas são compostas por uma população heterogênea de células derivadas do trofotoderma embrionário (Xiao *et al.*, 2020). As células-tronco do trofotoderma originam tanto o citotrofoblasto, que posteriormente se diferencia em duas subpopulações - o trofoblasto viloso e extraviloso - quanto o sinciciotrofoblasto, uma massa celular multinucleada que infiltra ativamente a decidua materna (Arora *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2020). No final do primeiro trimestre, os trofoblastos extravilosos adquirem capacidades migratórias e orquestram a remodelação das artérias espiraladas para garantir um suprimento sanguíneo materno-fetal adequado (Burton e Fowden, 2015).

Figura 1: Representação esquemática da composição celular das vilosidades da placenta humana.



Fonte: Adaptado de Xiao *et al.*, 2020. Uma camada de células multinucleadas de sinciciotrofoblasto cobre uma camada unicelular de citotrofoblasto. Nas pontas das vilosidades placentárias ficam

colunas de citotrofoblastos que são proliferativos e dão origem ao citotrofoblasto extraviloso invasivo que ajuda a ancorar a placenta ao útero e interagir com as arteríolas e veias uterinas maternas.

O processo inicial da gestação, que envolve a implantação do embrião na decídua e remodelamento dos vasos sanguíneos, requer uma resposta imune majoritariamente pró-inflamatória (Th1) mediada por citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF (Dekel *et al.*, 2010; Mor e Cardenas, 2010; Otun *et al.*, 2011). Em contrapartida, o segundo trimestre gestacional é marcado por uma maior tolerância imunológica para evitar a rejeição do feto semialogênico em desenvolvimento e, portanto, há a prevalência de um perfil anti-inflamatório (Th2) regulado, principalmente, por citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β (Abu-Raya *et al.*, 2020; Rezende-Oliveira *et al.*, 2012). Finalmente, no último trimestre, há um reestabelecimento do microambiente preferencialmente pró-inflamatório que atua no preparo do organismo materno para a contração uterina e expulsão do feto e da placenta (Abu-Raya *et al.*, 2020; Mor e Cardenas, 2010).

Além disso, uma gravidez a termo bem-sucedida requer um equilíbrio entre a tolerância imunológica para o feto e a responsividade a possíveis agentes infecciosos (Li *et al.*, 2020). Nesse sentido, o sincitiotrofoblasto desempenha um papel crucial na resposta imunológica materna oferecendo uma proteção robusta, além de atuar como barreira física devido à sua extensa área de superfície e falta de junções celulares (Turco e Moffett, 2019). Ademais, o citotrofoblasto exibe mecanismos de defesa inatos direcionados a patógenos intracelulares (Arora *et al.*, 2017). Ainda assim, alguns patógenos, como aqueles categorizados no grupo “TORCH” (*Toxoplasma gondii*, vírus da hepatite B, vírus da rubéola, citomegalovírus, vírus herpes simplex), são capazes de atravessar a barreira placentária e estabelecer infecções congênitas (Arora *et al.*, 2017; Turco e Moffett, 2019).

1.2 *Toxoplasma gondii*: ASPECTOS GERAIS, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E CICLO BIOLÓGICO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, causador da toxoplasmose, capaz de infectar um amplo espectro de animais endotérmicos e tipos celulares (Dubey *et al.*, 2012; Montoya e Liesenfeld, 2004). Este filo de parasitos se caracteriza pela presença de um complexo apical, que consiste em uma estrutura composta de elementos de citoesqueleto associados a organelas secretoras também chamadas de micronemas e roptrias (Boothroyd e Dubremetz, 2008). Essas organelas, em conjunto com os grânulos densos liberam progressivamente seus conteúdos

proteicos e participam de processos essenciais para a infecção do parasito como adesão e invasão das células, bem como para a formação de vacúolos parasitóforos, estruturas importantes para a evasão do parasito da resposta imune do hospedeiro (Boothroyd e Dubremetz, 2008; Laliberté e Carruthers, 2008).

O primeiro contato entre o parasito e a célula hospedeira se dá por meio da interação de antígenos de superfície (SAG1) do parasito e receptores de membrana celular (Gubbels e Duraisingh, 2012). Em um segundo momento, proteínas adesinas são liberadas pelas micronemas (MICs) em um evento dependente de Ca_2 (Keeley e Soldati, 2004). Essa adesão inicial é reversível e permite que *T. gondii* “deslize” sobre a superfície celular em um fenômeno de motilidade chamado “*gliding*”, que envolve um sistema motor de actina-miosina ancorado na membrana interna do parasito. Após esse reconhecimento, o parasito se reorienta de modo que seu ápice, contendo as organelas secretoras, esteja em contato com a membrana hospedeira (Carruthers e Boothroyd, 2007). As micronemas liberam mais MICs fortalecendo a adesão, seguidas pela formação do “anel de aperto” (“*moving junction*”) mediada por proteínas liberadas pelas roptrias (RONs) (Hunter e Sibley, 2012). Nessa etapa as membranas plasmáticas do hospedeiro e do parasito estão em contato íntimo, criando uma interface estável, em formato de um pequeno anel, que facilita a invasão (Carruthers e Boothroyd, 2007). Em sequência, outras proteínas secretadas pelas roptrias (ROPs) são injetadas no local da invasão, e são essenciais para a sobrevivência do parasito, uma vez que, auxiliam na formação do vacúolo parasitóforo (Boothroyd e Dubremetz, 2008; Gubbels e Duraisingh, 2012). Apesar de os grânulos densos não estarem localizados no complexo apical, são organelas secretoras importantes que liberam seus conteúdos proteicos (GRAs) após a invasão e durante a replicação intracelular (Gubbels e Duraisingh, 2012). As GRAs são essenciais para a manutenção do vacúolo parasitóforo pois se aderem aos limites citoplasmáticos deste vacúolo, estabilizando-o e impedindo a sua fusão aos lisossomos, permitindo a replicação e disseminação de *T. gondii* (Black e Boothroyd, 2000).

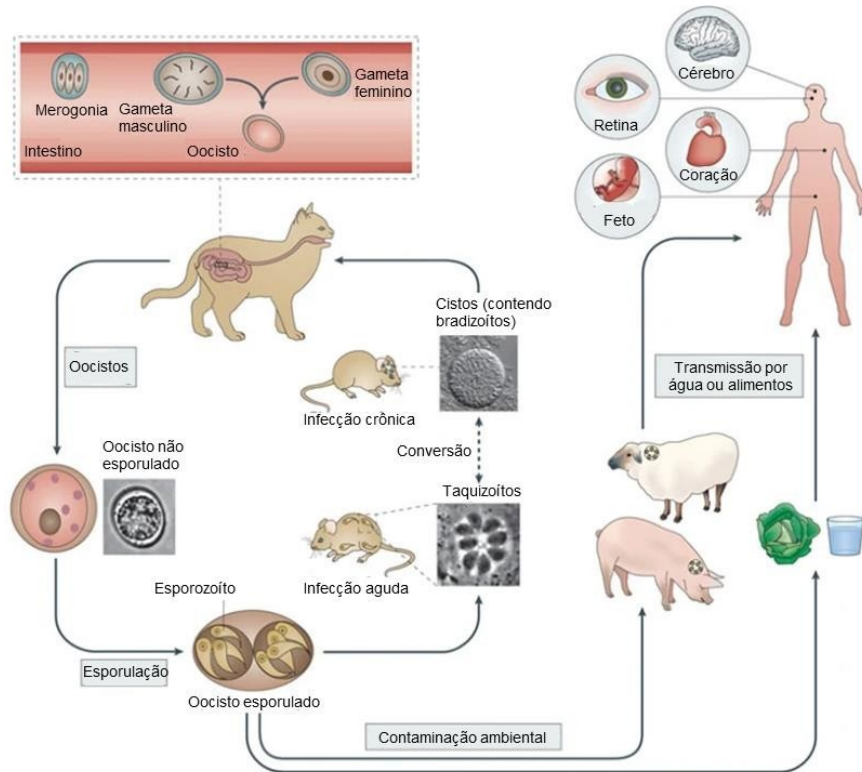
Os seres humanos são considerados hospedeiros intermediários da toxoplasmose (Ahmed *et al.*, 2020). A fase sexuada do ciclo de vida de *T. gondii* ocorre somente em animais da família dos felídeos, incluindo os gatos domésticos, tornando-os hospedeiros definitivos, e consequentemente, reservatórios do parasito (Rezaei *et al.*, 2019). Existem três formas evolutivas infecciosas de *T. gondii*: (1) os oocistos, altamente resistentes, que quando eliminados nas fezes dos felídeos, sofrem esporulação, liberam os esporozoítos, e

contaminam solo, plantações e fontes de água (Milne, Webster e Walker, 2020); (2) os taquizoítos que se multiplicam rapidamente no interior das células hospedeiras (Weiss e Dubey, 2009) e (3) os bradizoítos, os quais dentro de cistos teciduais podem permanecer indefinidamente nos tecidos humanos, preferencialmente no tecido nervoso, muscular cardíaco, muscular esquelético e retina (Stelzer *et al.*, 2019).

A transmissão ocorre por meio do consumo de alimentos mal lavados ou água contaminados com os oocistos, ingestão de carne crua ou malcozida contendo os cistos teciduais (Schlüter *et al.*, 2014), transplante de órgãos, doação de sangue ou de forma vertical (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Uma vez ingeridos por novos hospedeiros, os esporozoítos se transformam em taquizoítos que penetram ativamente nas células do epitélio estomacal e/ou intestinal e se replicam até que a mesma se rompa, tornando possível a infecção das células vizinhas. Esse estágio do ciclo representa a fase aguda da doença (Schlüter *et al.*, 2014). Os taquizoítos, então, se internalizam em cistos, se diferenciando em bradizoítos, que possuem replicação mais lenta. Essa diferenciação caracteriza a fase crônica da toxoplasmose e garante a manutenção da doença, uma vez que os cistos teciduais são mais resistentes à defesa imunológica do hospedeiro e podem permanecer no organismo durante toda a vida (Rougier, Montoya e Peyron, 2017; Smith *et al.*, 2021). Caso haja a ingestão de carne contaminada, os cistos se rompem ao passar pelo trato digestivo, liberando os bradizoítos que podem infectar o epitélio intestinal, local onde se multiplicação no hospedeiro intermediário ou, então, definitivo (Black e Boothroyd, 2000; Stelzer *et al.*, 2019).

É no intestino dos hospedeiros definitivos que os bradizoítos sofrem um número autolimitado de multiplicações assexuadas, que implicarão no desenvolvimento de merozoítos dentro dos esquizontes, seguido da formação dos micro e macrogametas (masculino e feminino, respectivamente) do parasito. Após a fertilização desses gametas, um zigoto diploide irá se desenvolver dentro dos oocistos, os quais serão excretados para o meio ambiente junto com as fezes do animal. Esses oocistos são inicialmente eliminados em um estado imaturo e requerem aproximadamente 2 dias para amadurecer no ambiente e ganhar infectividade total, processo chamado de esporogonia, concluindo assim o ciclo de vida de *T. gondii* (Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

Figura 2: Representação esquemática do ciclo biológico de *T. gondii*.



Fonte: Adaptado de Hunter e Sibley, 2012.

A prevalência da toxoplasmose difere de acordo com a localização geográfica, clima, hábitos culturais e condições socioeconômicas, como saneamento básico e higiene (Flegr *et al.*, 2014; Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Países da América do Norte, Sudoeste Asiático e Norte da Europa possuem uma prevalência de 10 a 30 %, enquanto em países da região central e sul da Europa em torno de 30 a 50%. Por outro lado, países tropicais, como os da América do Sul e alguns países africanos, apresentam uma soroprevalência maior, variando de 30 a 90% (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Além disso, a alta prevalência também pode estar associada aos genótipos do parasito. Basicamente, *T. gondii* possui uma população clonal derivada de três linhagens principais (I, II e III) encontradas em países da Europa e América do Norte (Aguirre *et al.*, 2019; Howe e Sibley, 1995). Também possui ampla variedade genética na América Central e do Sul (Fernández-Escobar *et al.*, 2022) e, por isso, genótipos que não se encaixam em uma dessas três linhagens são chamados de atípicos (Franco *et al.*, 2019). Estudos demonstram

que existe ainda uma quarta linhagem, observada principalmente em animais selvagens na América do Norte (Khan *et al.*, 2011).

No Brasil, destacam-se quatro linhagens principais, sendo elas BrI, BrII, BrIII e BrIV (Pena *et al.*, 2008). Análises em modelos animais infectados demonstraram que a linhagem BrI apresenta alta virulência, BrIII baixa virulência, enquanto BrII e BrIV média virulência (Pena *et al.*, 2008). Intrínsecas à essas linhagens, duas cepas do parasito, TgChBrUD1 pertencente ao genótipo BrII e TgChBrU2 à BrI (Franco *et al.*, 2019) foram isoladas na cidade de Uberlândia - MG, a partir de amostras de coração de galinhas caipiras (Lopes *et al.*, 2016), o que demonstra o alto potencial de disseminação de *T. gondii* no ambiente e de infectar animais cotidianamente consumidos pelos seres humanos.

1.3 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR *T. gondii*

Em um primeiro momento, *T. gondii* é reconhecido por células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos estimulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF (Laliberté e Carruthers, 2008; Miller *et al.*, 2009). Essas citocinas, por sua vez, ativam a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e também por células NK, que atuam produzindo e secretando mediadores inflamatórios como IFN- γ (Miller *et al.*, 2009). A ativação de macrófagos por IFN- γ promove a redução ou eliminação de *T. gondii* por mecanismos mediados por óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasito (Miller *et al.*, 2009; Yarovsky, 2014). Outras citocinas pró-inflamatórias também participam do controle da infecção como é o caso da IL-6 e do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) (Silva, da *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2020a). Apesar dessa resposta imune ser essencial no controle do parasitismo, uma resposta inflamatória exacerbada é prejudicial para as células e tecidos do hospedeiro. Por isso, é importante que exista um equilíbrio entre os perfis Th1 (predominantemente pró-inflamatório) e Th2 (predominantemente anti-inflamatório). Esse equilíbrio pode ser mediado pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e o fator de crescimento transformador TGF- β 1, que atuam no controle da produção e, consequentemente, das funções de IL-12 e IFN- γ contra *T. gondii* (Yarovinsky, 2014).

1.4 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Apesar de a maioria dos casos de toxoplasmose em humanos ser assintomática, a preocupação com a infecção consiste no estabelecimento de cistos do parasito nos tecidos

do hospedeiro, o que pode persistir de forma crônica no organismo e reativar a infecção em casos de supressão do sistema imunológico ou até mesmo durante a gravidez (Ahmed, Sood e Gupta, 2020; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Quando adquirida ou reativada durante ou pouco antes da gestação, a infecção pode resultar em transmissão vertical, atingindo os tecidos fetais (Kodjikian *et al.*, 2004; Montoya e Liesenfeld, 2004). A transmissão ocorre devido a passagem transplacentária de taquizoítos e, contudo, seu risco é inversamente proporcional ao tempo de gestação. Enquanto o risco de infecção fetal no primeiro trimestre é em torno de 10-25%, no segundo trimestre as chances de transmissão aumentam para 30% e no terceiro trimestre pode alcançar entre 60% a 90% (Fallahi *et al.*, 2018). Por outro lado, apesar de ser mais difícil de ocorrer, quando a infecção se estabelece no primeiro trimestre, é considerada clinicamente mais grave devido à alta possibilidade de aborto, alterações neurológicas e má formação fetal (Fallahi *et al.*, 2018). Essa variação pode se dar devido a anatomia da própria placenta, já que sua espessura diminui progressivamente até o final da gravidez para acompanhar o crescimento fetal (Dubey *et al.*, 2021; Robert-Gangneux *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, para que o feto semialogênico se desenvolva apropriadamente no organismo materno, principalmente a partir do segundo trimestre, predomina-se uma regulação imunológica mediada por citocinas anti-inflamatórias e reguladoras (Abu-Raya *et al.*, 2020). Entretanto, um ambiente caracterizado por um perfil Th2, somado ao estreitamento da barreira placentária favorece a infecção por *T. gondii*, e, consequentemente, a toxoplasmose congênita (Rezende-Oliveira *et al.*, 2012; Robert-Gangneux *et al.*, 2011). Uma vez confirmada, a toxoplasmose congênita pode levar a complicações graves no feto e/ou neonatos, incluindo abortos, natimortos, restrição de crescimento, malformações, danos neurológicos, encefalite, coriorretinite e calcificações cerebrais (Li *et al.*, 2014; Moncada e Montoya, 2012).

1.5 TRATAMENTO

No caso de infecção materna confirmada, o tratamento de primeira escolha nas primeiras 18 semanas de gestação, consiste na administração de espiramicina, um antibiótico macrolídeo (Moncada e Montoya, 2012; Peyron *et al.*, 2017). Apesar de não apresentar alta toxicidade, a espiramicina não é capaz de atravessar a barreira placentária e, por isso, é usada profilaticamente em mulheres grávidas para prevenir a transmissão materno-fetal do parasito (Dunay *et al.*, 2018).

Em caso de confirmação de infecção fetal com 18 semanas ou mais de gestação, recomenda-se a combinação de sulfadiazina e pirimetamina com suplementação de ácido fólico (Montoya e Remington, 2008). Sinergicamente, esses medicamentos inibem a diidropteroato sintase (DHPS) e a diidrofolato redutase (DHFR), enzimas cruciais para a sobrevivência e replicação do parasito (Doliwa *et al.*, 2013; I. Villena, 1998). No entanto, são ineficazes durante a fase latente da infecção e podem estar associados a efeitos adversos, incluindo supressão da medula óssea, distúrbios gastrointestinais, alergias e teratogenicidade se a pirimetamina for usada no primeiro trimestre de gestação, levando à descontinuação do tratamento (Ben-Harari, Goodwin e Casoy, 2017). Além disso, foram relatadas na literatura cepas de *T. gondii* resistentes a esses medicamentos, o que complica ainda mais o manejo da toxoplasmose congênita (Aspinall *et al.*, 2002; Montazeri *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2017).

1.6 CHALCONAS

Neste cenário preocupante, a literatura atual destaca os produtos naturais como uma fonte promissora de compostos biologicamente ativos e com propriedades antiparasitárias (Lucas *et al.*, 2021; Mamede *et al.*, 2020; Soto-Sánchez, 2022). Nosso grupo de pesquisa tem se esforçado na busca de formas alternativas de tratamento para a toxoplasmose congênita, com menor toxicidade e maior eficiência. Ilustrando isso, através de modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo* de interface materno-fetal, relatamos compostos naturais distintos com ação promissora contra *T. gondii* (Martínez *et al.*, 2023; Melo Fernandes, de *et al.*, 2023; Teixeira *et al.*, 2020; Teixeira, Rosini, *et al.*, 2023).

As chalconas são compostos pertencentes à família dos flavonoides, facilmente encontrados em plantas e produtos comumente consumidos por humanos, como leguminosas, frutas, grãos integrais e vinhos (Rudrapal *et al.*, 2021). Esta classe de compostos possui uma estrutura de 1,3-difenilprop-2-en-1-ona que é considerada versátil para modificações estruturais (Ni, Meng e Sikorski, 2004; Oliveira *et al.*, 2023). Portanto, as chalconas têm ganhado destaque devido à sua alta biodisponibilidade, facilidade de produção sintética e numerosas propriedades bioativas, incluindo anticâncer (Xiao *et al.*, 2021), antibacterianas (Khan e Asiri, 2017; Xu *et al.*, 2019), anti-inflamatórias e antiparasitárias (Oliveira, de *et al.*, 2022; Trein *et al.*, 2019), inclusive anti-*T.gondii* (Jiang *et al.*, 2022; Si *et al.*, 2018).

Apesar de suas propriedades biológicas relatadas, ainda não há estudos que abordem os efeitos das chalconas sobre *T. gondii* na interface materno-fetal humana.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*T. gondii* de análogos sintéticos de chalconas, bem como desvendar os possíveis mecanismos de ação subjacentes relacionados ao controle do parasitismo. Para isto, utilizamos dois modelos experimentais bem estabelecidos e amplamente utilizados para o estudo materno-fetal, sendo um deles *in vitro* por meio de células trofoblásticas de vilosidades humanas (células BeWo) e outro *ex vivo* utilizando explantes de vilosidades humanas de terceiro trimestre gestacional (Barbosa *et al.*, 2014; Rosini *et al.*, 2022; Silva, da *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2020; Teixeira, *et al.*, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

Diante dos fatos acima supracitados, sabe-se que a toxoplasmose congênita representa um problema de saúde pública mundial. Apesar de sua alta prevalência, ainda não foram desenvolvidos fármacos com mecanismos de ação específicos contra o parasito e que causem pouco ou nenhum efeito indesejável ao hospedeiro. O tratamento convencional pode causar diversos efeitos colaterais que prejudicam sua adesão, além de não serem completamente eficazes. Dito isso, é de extrema importância a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias para a toxoplasmose congênita, com maior especificidade, eficiência e menos efeitos colaterais.

Considerando que os compostos naturais têm ganhado destaque no universo acadêmico-científico e que as chalconas apresentam potentes atividades biológicas, inclusive antiparasitárias, além de serem moléculas versáteis quando se trata da produção sintética, compostos sintéticos análogos a essa classe de compostos foram produzidos e cedidos pelo Prof. Dr. Luís Octávio Regasini da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), de São José do Rio Preto, a fim de estudar seus efeitos contra *T. gondii* em modelos experimentais de toxoplasmose congênita.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anti-*T. gondii* de compostos sintéticos análogos à chalconas em modelos de interface materno-fetal humana, através de análises *in vitro* e *ex vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a viabilidade de células BeWo tratadas com as chalconas;
- Determinar os índices de proliferação intracelular e reversibilidade de taquizoítos de *T. gondii* em células BeWo tratadas com as concentrações não citotóxicas das chalconas;

- Avaliar o efeito das chalconas na morfologia e ultraestrutura parasitária (microscopias eletrônicas de transmissão e varredura);
- Avaliar se o pré-tratamento de taquizoítos com as chalconas influenciam na adesão, invasão e subsequente proliferação intracelular do parasito em células BeWo;
- Avaliar se os tratamentos influenciam na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células BeWo;
- Avaliar se os tratamentos modulam a resposta inflamatória das células hospedeiras pela mensuração de citocinas liberadas no sobrenadante de células BeWo tratadas na presença ou ausência de infecção;
- Realizar ensaios de viabilidade em explantes vilosos de placentas humanas de terceiro trimestre gestacional;
- Determinar os índices de proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes vilosos, frente ao tratamento com as chalconas;
- Mensurar as citocinas liberadas no sobrenadante de explantes vilosos tratados na presença ou ausência da infecção por *T. gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES *IN VITRO*

4.1.1 CULTURA CELULAR E MANUTENÇÃO DE *T. gondii*

Células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) foram adquiridas do “*American Type Culture Collection*” (ATCC, CCL-98, Manassas, VA, EUA) e cultivadas em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (Barbosa *et al.*, 2014).

Taquizoítos de *T. gondii*, clone 2F1, derivados da cepa RH, altamente virulenta e que expressam a enzima β-galactosidase, foram cedidos pelo Professor Dr. Vern Carruthers, da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Esses taquizoítos foram propagados em células BeWo mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB a 37° C e 5% de CO₂ (Barbosa *et al.*, 2014).

4.1.2 CHALCONAS

As chalconas utilizadas neste estudo foram sintetizadas e fornecidas pelo Prof. Luís Octávio Regasini da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil. As chalconas foram: C2 (siringaldeído 4-OMe), C4

(siringaldeído 3,4-di-OMe) e C9 (3,4-di-OMe isovanilina). Suas estruturas químicas estão apresentadas na **Figura 2**. Para obtenção das diluições de armazenamento, as amostras liofilizadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas em uma concentração de 50.000 µg/mL a -80°C.

4.1.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a citotoxicidade das chalconas em células BeWo, o ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 brometo de difeniltertrazolim)] foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983), com modificações (Teixeira *et al.*, 2020). Células BeWo à $3,0 \times 10^4$ /poço foram plaqueadas em microplacas de 96 poços. Após adesão *overnight*, as células foram tratadas com diluições seriadas de C2, C4 e C9 (variando de 0,5 a 128 µg/mL) por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. O grupo controle recebeu apenas meio de cultura RPMI com 10% de SFB e, para o veículo controle, células BeWo foram tratadas com DMSO 0,25% em meio RPMI, que corresponde ao percentual de DMSO presente na maior concentração das chalconas testadas (128 µg/ mL). Posteriormente, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e uma solução de 10 µL do reagente MTT (5 mg/mL) mais 90 µL de meio RPMI suplementado foram adicionados às monocamadas de células seguido por incubação durante 4 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, os poços receberam uma solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% e N,N-dimetilformamida (DMF) a 50% para solubilização dos cristais de formazan e após incubação *overnight*, a redução do MTT foi medida por absorbância (570 nm) usando um espectrofotômetro (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A viabilidade celular foi expressa em porcentagens (% viabilidade celular), com a densidade óptica das células incubadas apenas com meio de cultura sendo considerada como 100% viável. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes com oito replicatas.

4.1.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE *T. gondii*

A fim de se estabelecer as melhores concentrações para os próximos experimentos, avaliamos se C2, C4 e C9 seriam capazes de controlar a proliferação intracelular do parasito utilizando o ensaio colorimétrico de β-galactosidase, conforme descrito anteriormente (Barbosa *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2020). Para este propósito, células BeWo a $3,0 \times 10^4$ /poço foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, deixadas para aderir *overnight* e infectadas com taquizoítos de *T. gondii* em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1 (proporção de parasitos por célula) por um período de 3 horas a

37°C e 5% de CO₂ (Barbosa *et al.*, 2014, 2015). Depois disso, as células foram cuidadosamente lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) para remover os parasitos extracelulares remanescentes e tratadas com diluições seriadas de C2, C4 e C9 (variando de 0,5 a 128 µg/mL) por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. A associação de sulfadiazina e pirimetamina (S+P) foi utilizada como controle positivo para simular o tratamento convencional da toxoplasmose. A concentração de S+P (200 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente) foi escolhida com base em dados publicados, uma vez que foi relatada como não tóxica para células BeWo (Silva, da *et al.*, 2017). Células infectadas e incubadas apenas com meio RPMI foram utilizadas como controle negativo representando o crescimento normal de *T. gondii*. A quantificação do parasito em amostras de células foi realizada pela reação da β-galactosidase utilizando o substrato reagente clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Posteriormente, a absorbância (570 nm) foi medida utilizando um espectrofotômetro (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), e a proliferação intracelular do parasito foi expressa em porcentagem (% proliferação de *T. gondii*). O número de taquizoítos foi calculado em comparação com uma curva padrão com taquizoítos livres (variando de 1×10⁶ a 15.625×10³ parasitas). A eficiência de cada condição de tratamento foi definida por comparação com o controle negativo (100% de proliferação). Foram realizados pelo menos três experimentos independentes com oito replicatas.

4.1.5 ENSAIO DE REVERSIBILIDADE

Após selecionar concentrações não citotóxicas de C2, C4 e C9 que apresentaram efeito inibitório na proliferação intracelular de *T. gondii*, investigamos se o efeito antiparasitário seria mantido mesmo após a remoção do tratamento. O ensaio de reversibilidade foi realizado conforme descrito anteriormente (Teixeira *et al.*, 2020). As células BeWo foram plaqueadas a 3,0x10⁴ células/poço em microplacas de 96 poços e após a adesão foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* à um MOI de 3:1 em meio RPMI suplementado. Os parasitas foram deixados para invadir as células hospedeiras por 3 horas e depois lavados uma vez para remover aqueles que não estavam aderidos. Na primeira etapa do experimento, as células infectadas foram tratadas com C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL), S+P (200+8 µg/mL, respectivamente; controle positivo) ou apenas meio de cultura (grupo não tratado; controle negativo) por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi removido e a proliferação

intracelular do parasito mensurada. Paralelamente, os tratamentos mencionados foram removidos e os meios substituídos por meio de cultura sem tratamento por mais 24 horas, permitindo a replicação do parasito durante este período adicional. Em ambas as situações, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi quantificada utilizando o ensaio de β -galactosidase. A taxa de reversibilidade foi representada em porcentagem (% de reversibilidade do tratamento) 24 horas após a remoção do tratamento, em comparação com o grupo não tratado e a condição de tratamento correspondente após 24 horas de tratamento. Foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas.

4.1.8 ENSAIO DE ADESÃO

Para investigar se as chalconas são capazes de prejudicar a adesão do parasito às células hospedeiras, procedemos com um ensaio de adesão, conforme descrito anteriormente (Teixeira *et al.*, 2020). Células BeWo foram plaqueadas a uma densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm. Após adesão *overnight*, as células foram fixadas com paraformaldeído (4%) durante 30 min à temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS 1X. Taquizoítos de *T. gondii* a um MOI de 3:1 foram pré-tratados com C2 (8 μ g/mL), C4 (8 μ g/mL), C9 (32 μ g/mL), S+P (200+8 μ g/mL; controle positivo) ou apenas meio de cultura (controle negativo) por 1 h a 37 °C e 5% de CO₂. Os parasitos pré-tratados foram centrifugados e ressuspensos em meio de cultura isento de tratamento antes da incubação com células BeWo previamente fixadas durante 3 h a 37 °C e 5% de CO₂. Logo em seguida, lavamos os poços com PBS 1X e os parasitos aderidos foram fixados com paraformaldeído conforme descrito acima. As lamínulas foram então incubadas com anticorpo primário policlonal anti-*T.gondii* feito em coelho (Abcam #20530; Waltham, MA, EUA) diluído 1:500 em solução de saponina PGN-0,01% por 1 h e lavado três vezes com PBS 1X. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo IgG anti-coelho conjugada com Alexa Fluor 488 diluído 1:500 em solução de saponina PGN-0,01% (Invitrogen, EUA #A11008; Waltham, MA, EUA), faloidina conjugada com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (diluído 1:50 em PGN+saponina) e o marcador de núcleo celular TO-PRO-3 Iodeto (Life Technologies, Waltham, MA, EUA) diluído 1:500 em PGN+saponina por mais 1 h no escuro em temperatura ambiente para marcar taquizoítos de *T. gondii*, F-actina e núcleos, respectivamente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e montadas em lâminas de vidro. Posteriormente, as amostras foram analisadas em microscopia confocal de fluorescência (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha) com microscópio invertido (Zeiss

Axiovert 200 M). Os resultados foram expressos pelo número de células BeWo com parasitas aderidos e pelo número total de parasitos aderidos por campo em um total de 20 campos escolhidos aleatoriamente. Foram realizados dois experimentos independentes com quatro replicatas.

4.1.7 ENSAIOS DE INVASÃO E PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE TAQUIZOÍTOS DE *T. gondii* PRÉ-TRATADOS COM CHALCONAS

A invasão e subsequente proliferação intracelular do parasito foram avaliadas através do pré-tratamento dos taquizoítos com as chalconas (Silva, da *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2020). Este experimento propõe a investigação de um possível efeito direto dos compostos sobre o parasito. Para isso, taquizoítos de *T. gondii* à um MOI de 3:1 foram pré-incubados com C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL) ou S+P (200 +8 µg/mL) por 1 h a 37 °C e 5% de CO₂. Parasitos pré-incubados apenas com meio de cultura foram utilizados como controle negativo. Logo em seguida, os parasitos foram centrifugados para ressuspensos em meio de cultura, para remoção do tratamento, e colocados em microplacas de 96 poços (100 µL/poço) contendo células BeWo previamente aderidas a 3,0x10⁴ células/poço. A interação do parasito com as células hospedeiras ocorreu por 3 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Para a análise de invasão, o sobrenadante foi removido, as monocamadas de células infectadas foram cuidadosamente lavadas com PBS 1X para remoção de parasitos extracelulares e a quantificação da invasão foi realizada imediatamente. Para análise de proliferação intracelular, realizamos o mesmo protocolo descrito acima, mas após a invasão de 3 horas, novo meio de cultura foi adicionado à monocamada de células infectadas por mais 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em ambas as abordagens experimentais, o número de parasitas intracelulares foi quantificado utilizando o ensaio de β-galactosidase, conforme descrito anteriormente. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes com oito replicatas.

4.1.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para investigar os mecanismos envolvidos na atividade anti-*Toxoplasma* das chalconas, observamos a ultraestrutura dos taquizoítos de *T. gondii* tratados com C2, C4 e C9 por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Elazab e Arafa, 2022; Portes *et al.*, 2012) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) seguindo protocolo descrito anteriormente (Silva, da *et al.*, 2017).

Para TEM, as células BeWo foram plaqueadas a $1,0 \times 10^6$ células/poço em microplacas de 6 poços e após adesão *overnight*, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* à um MOI de 3:1 em meio RPMI suplementado por 3 h em 37 °C e 5% de CO₂. As células infectadas foram lavadas e incubadas com C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL), S+P (200+8 µg/mL; controle positivo) ou apenas meio de cultura suplementado (controle negativo) por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram desaderidas, coletadas e fixadas em solução de Karnovsky contendo paraformaldeído 2% e glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) por 24 h. Após as 24h, as amostras foram pós-fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em solução de cacodilato, seguido da adição de ágar. As amostras foram mantidas a 4°C por aproximadamente 2 dias até serem finalmente desidratadas em concentrações crescentes de etanol e óxido de propileno e então incluídas em resina Epon. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Hitachi, TM 3000).

Para realização de MEV, taquizoítos de *T. gondii* a $1,0 \times 10^6$ parasitos/1000µl foram pré-tratados ou não com C2, C4, C9 e S+P (mesmo procedimento experimental descrito acima). Após o pré-tratamento, os parasitos foram centrifugados para remoção do tratamento, lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e fixados em solução de Karnovsky por 2 horas a 4° C. Após duas lavagens sucessivas com tampão cacodilato de sódio, os parasitos foram pós-fixados em OsO₄ a 1% em solução de cacodilato durante 1 h à temperatura ambiente. Os taquizoítos fixados foram lavados novamente com tampão cacodilato de sódio e depositados em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm. Após secagem *overnight*, as lamínulas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Tescan, VEGA 3 LMU).

4.1.9 DOSAGEM INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Para verificar o impacto das chalconas na produção intracelular de EROs, mensuramos as EROs em células BeWo com base na oxidação intracelular dependente de peróxido de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) (Invitrogen) para formar o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), conforme descrito anteriormente, com algumas modificações (Costa *et al.*, 2019; Kian *et al.*, 2018). Resumidamente, células BeWo a $3,0 \times 10^4$ /poço foram plaqueadas em microplacas de 96 poços escuras com fundo transparente (Costar REF# 3603, Nova Iorque, EUA). Após

adesão *overnight*, as células foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* à um MOI de 3:1 por 3 h, lavadas com PBS 1X e depois tratadas com C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL), S+P (200+8 µg/mL) ou apenas meio de cultura por 24 h a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, os sobrenadantes de todas as condições experimentais foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior medição de citocinas. As monocamadas celulares foram incubadas com 150 µL de H₂DCF-DA (10 µM; diluído em PBS 1x contendo 10% de SFB) durante 45 min no escuro a 37 °C e 5% de CO₂. Para controle positivo da produção de EROs, quatro poços receberam peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Por fim, as células foram novamente lavadas com PBS 1x e a microplaca submetida à leitura em espectrofotômetro (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 550 nm. Os dados foram apresentados como Intensidade Mediana de Fluorescência (IMF). Quatro experimentos independentes com doze replicatas foram realizados.

4.2 ANÁLISES *EX VIVO*

4.2.1 CULTURA DE EXPLANTES VILOSOS DE PLACENTAS HUMANAS

Para complementar nossos achados *in vitro*, também procedemos com um modelo experimental *ex vivo* da interface materno-fetal humana para avaliar os efeitos antiparasitários das chalconas (Castro-Filice *et al.*, 2014; Oliveira Gomes, De *et al.*, 2011). Resumidamente, explantes de vilosidades coriônicas de terceiro trimestre foram coletados de placentas humanas (36 a 40 semanas de gestação, N = 3) após partos cesáreos eletivos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), MG, Brasil. As placentas eram de pacientes sem comorbidades, como pré-eclâmpsia, hipertensão crônica, doenças infecciosas (por exemplo, toxoplasmose, doença de Chagas), doença renal crônica, doença cardíaca, doença do tecido conjuntivo, diabetes mellitus pré-existente, diabetes mellitus gestacional e outras manifestações patológicas. Vilosidades coriônicas terminais contendo cinco a sete pontas livres por explante foram dissecadas até 1 h após coleta da placenta. Os tecidos placentários foram então adicionados a microplacas de 96 poços (uma vilosidade por poço) em 200 µL/poço de um meio RPMI suplementado com 10% de SFB por 24 horas a 37 °C sob uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ até o procedimento experimental.

O presente protocolo de pesquisa foi realizado de acordo com diretrizes e regulamentos pertinentes, sendo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal

de Uberlândia, MG, Brasil, com número de aprovação 5.812.532. Um termo de consentimento foi obtido de todos os participantes incluídos neste estudo.

4.2.2 ENSAIO DE VIABILIDADE DE EXPLANTES VILOSOS HUMANOS

A viabilidade tecidual dos explantes vilosos sob tratamento com as chalconas foi realizada através dos ensaios de MTT e lactato desidrogenase (LDH), de acordo com protocolos publicados (Castro-Filice *et al.*, 2014; Mosmann, 1983; S. Vaidya, W. Walsh e M. Gerk, 2011). Após dissecação e incubação *overnight*, como mencionado acima, os explantes foram expostos a diluições seriadas de C2, C4 e C9 (variando de 0,5 a 128 µg/mL) durante 24 h. Como controle do veículo, tratamos as vilosidades com DMSO (0,25%) em meio RPMI, que corresponde ao percentual de DMSO presente na maior concentração das chalconas (128 µg/mL). Como controle de viabilidade, os explantes vilosos foram tratados apenas com meio de cultura. Após 24 h de incubação, os sobrenadantes foram coletados e a concentração de LDH medida de acordo com as instruções do fabricante (Lactato Desidrogenase LDH UV, Ref K014-2, Lote 0058) à 340 nm por um leitor de microplacas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Este ensaio é baseado no consumo e diminuição da absorção de NADH. A LDH liberada no meio de cultura foi expressa em U/L de atividade enzimática da LDH e foi utilizada como marcador de danos à integridade tecidual.

A viabilidade tecidual também foi avaliada pelo ensaio MTT. Após 24 h de tratamento, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e substituídos por uma solução de 20 µL do reagente MTT (5 mg/mL) mais 180 µL de meio RPMI suplementado seguido de uma incubação por 4 h. Subsequentemente, os cristais de formazan resultantes da redução do MTT foram solubilizados *overnight* pela adição de 100 µL de PBS contendo SDS 10% e DMF 50%. A redução do MTT foi medida no dia seguinte por meio de um espectrofotômetro (570 nm) (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e a viabilidade tecidual foi expressa em porcentagens (% de viabilidade pela incorporação do MTT), sendo a absorbância das vilosidades incubadas apenas com meio de cultura considerada como 100% viável. Além disso, realizamos análises morfológicas das vilosidades tratadas para corroborar com os ensaios de viabilidade. Secções de tecido de vilosidades foram coradas com hematoxilina/eosina (HE) e examinadas utilizando um microscópio óptico (BX40 Olympus, Tóquio, Japão). Um experimento com oito replicadas foi realizado para cada metodologia de viabilidade.

4.2.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE *T. gondii* EM EXPLANTES VILOSOS HUMANOS

Para quantificar a proliferação intracelular de *T. gondii* em explantes de vilosidades humanas, foi realizado o ensaio colorimétrico de β -galactosidase (Barbosa *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2020). Vilosidades previamente coletadas e cultivadas em microplacas de 96 poços foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* (1×10^6 parasitos por poço/200 μ L) e incubadas por 24 h a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as vilosidades foram tratadas por mais 24 h com C2, C4 ou C9 (32 e 64 μ g/mL) com base nos dados de viabilidade tecidual (ensaios de LDH e MTT). Sulfadiazina e pirimetamina (S+P) foram utilizadas como controle positivo nas concentrações de 150 μ g/mL e 200 μ g/mL, respectivamente (Silva, da *et al.*, 2017). Vilosidades infectadas e incubadas com meio RPMI na ausência de qualquer tratamento foram utilizadas como controle negativo. Após 24 h de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C, assim como as vilosidades placentárias. As mesmas condições experimentais foram aplicadas para explantes não infectados e tratados. Os sobrenadantes foram coletados para posterior medição de citocinas e explantes de vilosidades para determinação do conteúdo proteico utilizando reagente de Bradford e proliferação intracelular de *T. gondii* por ensaio de β -galactosidase com pequenas modificações.

Explantes vilosos congelados foram homogeneizados pela adição de 150 μ L de tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 a 1%, desoxicolato de sódio a 1% (p/v) e 0,1% (p/v) SDS, pH 7,5] contendo coquetel inibidor de protease (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha). O homogeneizado foi centrifugado a 21.000xg por 15 min a 4°C e os sobrenadantes foram coletados. Para medir a quantidade total de proteína utilizando o método de Bradford, 2 μ L de sobrenadante foram diluídos em 18 μ L de PBS 1X em microplacas de 96 poços, seguido pela adição do reagente de Bradford. A proliferação intracelular de *T. gondii* foi realizada utilizando ensaio de β -galactosidase, como mencionado acima, incubando 20 μ L de sobrenadante de cada amostra com 160 μ L de tampão de ensaio (PBS 1X, β -mercaptoetanol e MgCl₂) e 40 μ L de CPRG. A absorbância (570 nm) foi medida por espectrofotômetro (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O número de taquizoítos de *T. gondii* foi normalizado de acordo com a concentração total de proteína (μ g/mL) de cada vilo obtida pelo ensaio de Bradford, e expresso pelo número de parasitos por μ g de tecido (Barbosa *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2023). A proliferação de *T. gondii* em explantes vilosos foi expressa em porcentagem (%)

proliferação de *T. gondii*) e o número de taquizoítos calculado em comparação com uma curva padrão de taquizoítos livres (variando de 1×10^6 a $15,625 \times 10^3$ parasitas). A eficiência de cada condição de tratamento foi medida comparando-a com o controle negativo (100% de proliferação parasitária). Foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas.

4.3 DOSAGEM DE CITOCINAS

A liberação de citocinas nos sobrenadantes de células BeWo e explantes vilosos foi medida usando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) do tipo sanduíche de anticorpo duplo. Ensaios para IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α (OpTEIA, BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) e MIF (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas para experimentos com células BeWo foram expressas em pg/mL. A concentração de citocinas nos experimentos de vilosidades foi normalizada usando o conteúdo de proteína total (mg/mL) de cada vilosidade, obtido pelo método de Bradford e os resultados foram expressos em pg/mg de tecido. Os limites de detecção de cada citocina foram determinados a partir de curvas padrão: IL-4 e IL-6 (4,7 pg/mL); IL-8 IL-10, TNF- α e MIF (7,8 pg/mL).

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram primeiro verificados quanto à distribuição normal e expressos como médias $\pm$ erro padrão da média (SEM), usando o software *GraphPad Prism* versão 8.0.1 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA). As diferenças de significância foram comparadas aos controles usando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett para os dados paramétricos. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças entre dois grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student não pareado ou pelo teste de Mann-Whitney, para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 BAIXAS DOSES DE CHALCONAS REDUZIRAM A PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE *T. gondii* EM CÉLULAS BEWO

Primeiramente, as células BeWo foram expostas a diluições seriadas de C2, C4 e C9 durante 24 h para avaliar o efeito das chalconas na viabilidade celular. Conforme

mostra a figura 4, as células tratadas com C2 e C4 demonstraram perda de viabilidade celular apenas quando tratadas a partir de 16 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 4A, B**), enquanto aquelas tratadas com C9 apresentaram queda na viabilidade apenas nas concentrações mais altas (64 e 128 $\mu\text{g/mL}$) em comparação com células não tratadas (controle negativo; meio) ($****P<0,0001$) (**Fig. 4C**). O controle do veículo (0,25% de DMSO) não reduziu a viabilidade celular em comparação com o grupo não tratado (**Fig. 4A-C**). Em seguida, verificamos a proliferação intracelular do parasito quando células BeWo infectadas por *T. gondii* foram expostas às diferentes concentrações de C2, C4 ou C9 (variando de 0,5 a 128 $\mu\text{g/mL}$). Como esperado, o tratamento com S+P foi capaz de reduzir a replicação do parasito em aproximadamente 50% quando comparado com células infectadas/não tratadas (meio) (**Fig. 4D-F**) ($****P<0,0001$). Curiosamente, foi observado que concentrações não citotóxicas de chalconas também foram eficazes no controle do crescimento parasitário em comparação com as células não tratadas/infectadas (meio) ($P<0,05$) (**Fig. 4D-F**). Portanto, as concentrações de trabalho selecionadas foram: 8 $\mu\text{g/mL}$ para C2 e C4 e 32 $\mu\text{g/mL}$ para C9.

Nossos resultados preliminares demonstraram que C2, C4 e C9 foram capazes de controlar a proliferação intracelular de *T. gondii* em doses não citotóxicas para células BeWo. Calculando a metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}) contra *T. gondii* e a metade da concentração citotóxica máxima (CC_{50}) para células BeWo, encontramos um $\text{IC}_{50}=17,91 \mu\text{g/mL} \pm 0,44$ e um $\text{CC}_{50}=23,4 \mu\text{g/mL} \pm 5,63$ para C2. Da mesma forma, C4 demonstrou $\text{IC}_{50}=9,81 \mu\text{g/mL} \pm 3,01$ e $\text{CC}_{50}=38,03 \mu\text{g/mL} \pm 4,91$. Por fim, para C9 obtivemos $\text{IC}_{50}=27,59 \mu\text{g/mL} \pm 10,87$ e $\text{CC}_{50}=131,88 \mu\text{g/mL} \pm 14,92$ (**Tabela 1**). O valor do SI, também conhecido como índice terapêutico, foi obtido calculando-se a razão entre CC_{50} e IC_{50} ($\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$). Este valor fornece uma indicação de quão seletivamente um composto atinge um agente patogênico em relação à sua toxicidade para as células. Neste caso, C9 foi o composto com maior valor de SI (4,77) (**Tabela 1**), representando maior potencial terapêutico, pois foi eficaz em inibir a proliferação de *T. gondii* apresentando menor toxicidade para células BeWo em comparação com os outros compostos. Assim, observamos que as chalconas são potencialmente capazes de controlar a proliferação intracelular de *T. gondii* em doses não citotóxicas para as células.

6.2 O EFEITO ANTIPROLIFERATIVO MEDIADO PELAS CHALCONAS SOBRE *T. gondii* É IRREVERSÍVEL

Para investigar melhor se o tratamento com as chalconas poderia ser reversível, a quantificação do parasito foi realizada em duas condições experimentais: 24 horas após

o tratamento e 24 horas após a remoção do tratamento. Em concordância com os resultados apresentados na figura 4, após 24 h de tratamento com C2, C4, C9 ou S+P, a proliferação intracelular de *T. gondii* teve uma diminuição significativa quando comparada às células infectadas/não tratadas (meio) (**** $P < 0,0001$), dessa vez exibindo maior redução que o tratamento clássico com S+P (#### $P < 0,0001$) (**Fig. 5**). Curiosamente, 24 horas após a remoção do tratamento, o efeito antiproliferativo destes tratamentos manteve a sua eficácia em relação às células infectadas/não tratadas (meio) (**** $P < 0,0001$) e S+P (#### $P < 0,0001$) (**Fig. 5**). Comparando as duas situações (&), notamos que mesmo na ausência de tratamentos, o crescimento do parasito foi significativamente menor 24 horas após a remoção do tratamento (**Fig. 5**). Em resumo, S+P e chalconas apresentaram influência irreversível na replicação de *T. gondii*.

6.3 CHALCONAS INDUZIRAM DANOS ULTRAESTRUTURAIS NO PARASITO

Também investigamos o possível efeito direto de C2, C4 e C9 sobre os taquizoítos por microscopia eletrônica de transmissão. Como mostra a figura 6A, as células BeWo infectadas/não tratadas apresentaram vacúolo parasitóforo (PV) normal contendo taquizoítos com ultraestrutura inalterada, membrana dupla (ponta de seta), roptrias (Rp), núcleo (PNu) e grânulos densos (Dg). Não observamos nenhuma alteração ultraestrutural nos parasitos intracelulares expostos ao tratamento com C2 (**Fig. 6B**), em comparação com o grupo não tratado (meio) (**Fig. 6A**). Por outro lado, C4 e especialmente C9 promoveram a formação de estruturas semelhantes a vacúolos (setas pretas) circundando o vacúolo parasitóforo e no citoplasma do parasito (**Fig. 6C-E**). As células infectadas tratadas com C9 exibiram os danos mais significativos nos taquizoítos, mostrando uma maior quantidade qualitativa de estruturas semelhantes a vacúolos e ruptura de organelas (**Fig. 6D, E**).

6.4 O PRÉ-TRATAMENTO COM CHALCONAS PREJUDICOU A ADESÃO DOS TAQUIZOÍTOS DE *T. gondii* ÀS CÉLULAS BEWO

As primeiras etapas dos experimentos demonstraram a capacidade de C2, C4 e C9 em reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* de maneira irreversível, sem comprometer a viabilidade das células hospedeiras, desencadeando alterações ultraestruturais nos parasitos. Assim, tivemos interesse em observar a influência dessas chalconas durante o processo de adesão do parasita nas células hospedeiras. Para tanto, taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados foram submetidos a um ensaio de adesão. Nossos dados sobre análise de imunofluorescência demonstraram que S+P diminuiu tanto o número de células BeWo com parasitas aderidos quanto o número total de parasitas

aderidos por campo em comparação com os parasitas não tratados (meio) (* $P=0,0241$; * $P=0,0402$, respectivamente) (**Fig. 7A, B**). O mesmo fenômeno foi observado em parasitas previamente tratados com C4 e C9 em comparação com parasitas não tratados (médio) (**** $P<0,0001$). O pré-tratamento com C2 não induziu alterações significativas no número de parasitas aderidos ou no número total de parasitas aderidos por campo (**Fig. 7A, B**). Imagens representativas de imunofluorescência ilustrando as diferenças no número de parasitas aderidos nas células BeWo de acordo com o tipo de tratamento foram apresentadas nas figuras 7C-G.

6.5 PARASITOS PRÉ-TRATADOS COM CHALCONAS APRESENTARAM TAXAS DE INVASÃO E PROLIFERAÇÃO COMPROMETIDAS, BEM COMO DANOS SUPERFICIAIS

Posteriormente, verificamos se o pré-tratamento dos taquizoítos de *T. gondii* seria capaz de prejudicar a invasão e subsequente proliferação intracelular. Para tanto, os taquizoítos foram pré-tratados por 1 h com chalconas e submetidos a ensaios de invasão ou proliferação intracelular. Nossos achados mostraram que o tratamento convencional (S+P) não teve efeito na invasão do *T. gondii* quando comparado aos parasitas não tratados (meio). Entretanto, C2, C4 e C9 reduziram significativamente a taxa de invasão parasitária em relação aos parasitas não tratados (meio) (**** $P<0,0001$ para todos) e controle positivo (S+P) (#### $P<0,0001$ para todos) (**Fig. 8A**). Em relação ao ensaio de proliferação intracelular, S+P, C2, C4 e C9 foram eficazes na redução do parasitismo quando comparados aos parasitos não tratados (meio) (** $P=0,0001$ para S+P; **** $P<0,0001$ para C2, C4 e C9) (**Fig. 8B**). Todas as chalconas apresentaram inibição de mais de 50% na proliferação do parasito, sendo C2 e C9 capazes de controlar o parasitismo estatisticamente melhor que o pré-tratamento com S+P, sendo: C2 (# $P=0,0082$) e C9 (# $P=0,0241$) (**Fig. 8B**). Estes dados sugerem que o pré-tratamento de taquizoítos com C2, C4 e C9 prejudicou tanto a invasão como a subsequente proliferação intracelular de *T. gondii*.

Em seguida, realizamos MEV nesses parasitos pré-tratados com chalconas. Os tratamentos com C2, C4 e C9 foram capazes de desencadear alterações nas superfícies dos parasitos em comparação com os parasitos não tratados ou parasitas tratados com S+P (**Fig. 8C-G**). A análise morfológica dos taquizoítos de *T. gondii* não tratados exibiu forma característica em formato de arco com superfície lisa e regular (**Fig. 8C**). Os taquizoítos pré-tratados com S+P também apresentaram formato normal, embora suas superfícies apresentassem aspecto mais rugoso (**Fig. 8D**). Em contrapartida, os taquizoítos de *T. gondii*

tratados com C2, C4 e C9 apresentaram superfície rugosa e irregular, ruptura da membrana plasmática com estruturas semelhantes a buracos, torção e alterações substanciais em sua forma característica (**Fig. 8E-G**), demonstrando um efeito direto sobre os parasitos.

6.6 CHALCONAS MODULARAM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E EROs EM CÉLULAS BEWO

Na sequência, exploramos se esses compostos eram capazes de modular a produção celular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, MIF e TNF- α .

A infecção por *T. gondii* induziu um incremento na produção de EROs em todas as condições experimentais, em comparação com seus respectivos controles não infectados (**Fig. 9A**). Na ausência de infecção, C9 demonstrou efeito antioxidante, reduzindo a produção de EROs nas células em relação às células não tratadas e tratadas com S+P (**P=0,0037; ####P<0,0001, respectivamente). Este mesmo efeito se repetiu nas condições infectadas em relação ao grupo não tratado e infectado (*P=0,0234) (**Fig. 9A**).

Em relação à produção de MIF, notamos que a infecção por *T. gondii* regulou positivamente os níveis de MIF em comparação com as células não infectadas, exceto para o grupo tratado com S+P. Dados de células infectadas/não tratadas (M) (&&P=0,0079), C2, (&&P=0,0047), C4 (&&P=0,0027) e C9 (&&&P=0,0002) são mostrados na figura 9B. Comparações entre as condições infectadas revelaram que S+P e C4 diminuiram a secreção de MIF em relação às células infectadas/não tratadas (**P=0,0079; *P=0,0105, respectivamente). Por outro lado, C9 apresentou níveis mais elevados de MIF quando comparado ao tratamento S+P (##P=0,0082) (**Fig. 9B**), mantendo níveis semelhantes aos encontrados no grupo infectado/não tratado. Os níveis de MIF não mudaram significativamente nas células não infectadas (**Fig. 9B**).

Em relação à IL-6, foi observada liberação semelhante em ambos os grupos experimentais (não infectado/tratado e infectado/tratado). No entanto, na presença de infecção, as células BeWo tratadas com as chalconas apresentaram níveis mais elevados de IL-6 em comparação com aquelas tratadas com S+P (##P=0,0034; #P=0,0209; ##P=0,0064, respectivamente) (**Fig. 9C**). Finalmente, analisamos os níveis de IL-8 produzidos pelas células BeWo. Quando a infecção estava ausente, foi detectado um incremento de IL-8 nas células BeWo tratadas com C2 e C4 (**Fig. 9D**). Da mesma forma, na presença de infecção, C2 e C4 induziram níveis elevados de IL-8 em relação às células

infectadas/não tratadas (* $P=0,0241$; * $P=0,0381$, respectivamente). Curiosamente, a infecção por *T. gondii* causou uma regulação positiva de IL-8 pelas células sob tratamento com S+P em relação ao grupo infectado/não tratado (* $P=0,0154$) (**Fig. 9D**). A liberação de IL-4, IL-10 e TNF- α pelas células BeWo também foi medida, mas os níveis de IL-4 e TNF- α não foram detectados, e os níveis de IL-10 não apresentaram diferenças significativas (dados não mostrados).

Portanto, nossos dados sugerem que C2, C4 e C9 tiveram um efeito modulador no perfil de citocinas e na produção de EROs em células BeWo, especialmente modulando negativamente o MIF (C4), regulando positivamente a IL-8 (C2 e C4) e diminuindo os níveis de EROs (C9).

6.7 AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE CHALCONAS NÃO FORAM CAPAZES DE INDUZIR TOXICIDADE EM EXPLANTES DE VILOSIDADES HUMANAS

Para complementar nossos achados *in vitro*, também utilizamos explantes de vilosidades coriônicas humanas do terceiro trimestre, uma vez que este modelo experimental é o padrão ouro da interface materno-fetal humana. Primeiramente, explantes de vilosidades humanas foram coletados e expostos a diluições seriadas de C2, C4 e C9 durante 24 horas para avaliar o efeito das chalconas na viabilidade tecidual usando ensaios de MTT e LDH. Os resultados do ensaio de incorporação de MTT indicaram que nenhuma das concentrações testadas de C2, C4 e C9 afetou a viabilidade das vilosidades quando comparada com as vilosidades não tratadas (meio) (**Fig. 10A-C**), respectivamente. Além disso, a medição de LDH nos sobrenadantes revelou que apenas a maior concentração de C2 (128 $\mu\text{g/mL}$) causou um aumento significativo nos níveis de LDH quando comparado com vilosidades não tratadas (**** $P<0,0001$), sugerindo redução nas vilosidades integridade, enquanto todas as outras condições experimentais não mostraram evidência de lesão tecidual (**Fig. 10D-F**). Além disso, o veículo controle (0,25% DMSO) não apresentou toxicidade. Para corroborar esses dados, avaliamos a morfologia das vilosidades tratadas com chalconas utilizando cortes histológicos corados com HE. A integridade das vilosidades coriônicas tratadas com todos os tipos de chalconas permaneceu intacta, exibindo morfologia típica com uma camada sinciciotrofoblástica contínua circundando o mesênquima (M), semelhante à condição controle (**Fig. 10G-J**).

6.8 CHALCONAS REDUZIRAM A PROLIFERAÇÃO INTRACELULAR DE *T. gondii* E MODULARAM OS NÍVEIS DE TNF- α EM EXPLANTES DE VILOSIDADES HUMANAS

Após verificar que nenhuma das chalconas testadas apresentaram toxicidade ao tecido placentário em doses iguais ou inferiores a 64 $\mu\text{g/mL}$, o passo subsequente foi avaliar seu potencial efeito anti-*T. gondii*. Em concordância com dados anteriores do nosso grupo, as concentrações de 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de S+P, respectivamente, foram capazes de reduzir o parasitismo em explantes vilosos (**** $P < 0,0001$) (**Fig. 11A**). Semelhante ao controle positivo (S+P), ambas as concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ de C2, C4 e C9 diminuíram significativamente a proliferação intracelular do parasito quando comparadas ao controle negativo (vilosidades não tratadas) (**** $P < 0,0001$) (**Fig. 11A**).

Como as concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ das chalconas tiveram a mesma eficácia no controle da proliferação de *T. gondii* nos explantes, avaliamos o perfil de liberação de citocinas quando os mesmos foram tratados com a maior concentração não tóxica (64 $\mu\text{g/mL}$). Em relação à secreção de MIF, a única diferença significativamente relevante observada foi uma regulação negativa em explantes infectados/não tratados em comparação com o controle não infectado ($P = 0,0139$) (**Fig. 11B**). Quanto às condições experimentais tratadas, não foi detectada nenhuma redução significativa (**Fig. 11B**). Em relação ao TNF- α , notamos que na ausência de infecção, os níveis desta citocina foram reduzidos pelos tratamentos com S+P, C2, C4 e C9 em relação aos explantes não tratados (**** $P < 0,0001$ para S+P, C2 e C4 e ** $P = 0,030$ para C9). Em resposta à infecção por *T. gondii*, os níveis de TNF- α foram regulados positivamente em todas as amostras infectadas em comparação com os controles não infectados, com exceção do grupo tratado com S+P. Dados do grupo infectado/não tratado (M) ($P = 0,0018$), C2, ($P = 0,0060$), C4 ($P = 0,0014$) e C9 ($P = 0,0001$) são mostrados na figura 11C. Todas as chalconas, assim como S+P, foram capazes de reduzir a liberação de TNF- α em comparação às vilosidades infectadas/não tratadas (**** $P < 0,0001$; *** $P = 0,0003$; **** $P < 0,0001$; *** $P = 0,0005$, respectivamente). Os explantes infectados tratados com S+P não alteraram os níveis de TNF- α em relação ao seu controle não infectado (**Fig. 11C**). A liberação de IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 pelos explantes de vilosidades também foi mensurada, mas os níveis de IL-4 foram indetectáveis e os de IL-6, IL-8 e IL-10 não apresentaram diferenças significativas (dados não mostrados). Tomados em conjunto, estes resultados demonstram a eficácia das chalconas no controle de *T. gondii* em explantes placentários humanos, que foi

acompanhada pela regulação negativa da produção de TNF- α .

7. DISCUSSÃO

O tratamento convencional da toxoplasmose congênita após o primeiro trimestre, tipicamente baseado em uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina, enfrenta limitações significativas. Esses medicamentos podem causar efeitos colaterais graves, como mielossupressão e teratogenicidade, dificultando o seu uso (Moncada e Montoya, 2012). Além disso, a eficácia do tratamento na fase latente da infecção ainda é limitada e o diagnóstico precoce é crucial para minimizar os danos, o que muitas vezes não ocorre devido à falta de sintomas iniciais claros (Black e Boothroyd, 2000b). Estes desafios realçam a necessidade urgente de desenvolver terapias mais seguras e eficazes para a toxoplasmose congênita.

Modelos experimentais do ambiente da placenta, como células BeWo e explantes placentários, são ferramentas essenciais para compreender as interações da interface materno-fetal com patógenos (Araújo, de *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2008). A célula BeWo é uma linhagem celular trofoblástica isolada de coriocarcinoma humano, frequentemente utilizada para estudar a função placentária e a transferência de substâncias entre a mãe e o feto *in vitro* (Liu *et al.*, 2023; Pattillo, 1968). Essa linhagem mimetiza muitas características do trofoblasto *in vivo*, fornecendo um modelo eficaz para investigar mecanismos de infecção (Pattillo, 1968). Além disso, explantes placentários, que consistem em fragmentos de tecido cultivados *ex vivo*, oferecem uma representação mais precisa da arquitetura e funções da placenta (Miller *et al.*, 2005). Esses modelos permitem a observação direta das interações celulares e moleculares no ambiente placentário, contribuindo significativamente para a compreensão de doenças congênitas, como a toxoplasmose, e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A literatura atual tem relatado o efeito de chalconas e derivados de flavonóides contra *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Leishmania*. Zheoat *et al.* (2021) observaram efeito significativo de chalconas contra infecções por *T. brucei*, *T. congolense* e *L. mexicana* em células de fibroblastos humanos (Zheoat *et al.*, 2021). Além disso, vários derivados sintéticos de chalconas demonstraram capacidade de controlar infecções causadas por *T. cruzi*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *P. falciparum* com bom índice terapêutico (Cuellar *et al.*, 2022; Espinoza-Hicks *et al.*, 2019; González *et al.*, 2020). Além disso, estudos demonstraram a influência significativa das chalconas contra bactérias

periodontopatogênicas, bem como contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Santos, dos *et al.*, 2023; Satokata *et al.*, 2022). Assim, fica claro que as chalconas são potenciais candidatas a tratamentos alternativos contra muitos patógenos, incluindo *T. gondii*.

No cenário da toxoplasmose, Si *et al.* (2018) demonstraram que as licochalconas induziram um potente controle da proliferação de *T. gondii* em células de fibroblastos humanos, promovendo danos significativos na ultraestrutura do parasito (Si *et al.*, 2018). Além disso, vários derivados de chalconas induziram o controle do crescimento de *Toxoplasma in vitro* e *in vivo*, quando foram observadas HFF e células peritoneais murinas com menor número de parasitos (Jiang *et al.*, 2022).

Considerando que a toxoplasmose congênita é um problema de saúde pública mundial, particularmente em países em desenvolvimento, e dada a necessidade urgente de estabelecer tratamentos alternativos para esta condição, no presente trabalho avaliamos a ação anti-*T. gondii* de análogos sintéticos de chalconas na interface materno-fetal em ambos os modelos experimentais: células BeWo e vilos placentários humanos. Nosso estudo anterior (dados não publicados) de predição *in silico* com docking molecular revelou que as chalconas (C2, C4 e C9) exibiram uma maior afinidade de ligação ao sítio ativo da ornitina aminotransferase (TgOAT) de *T. gondii*, uma enzima envolvida na interconversão de intermediários de ornitina em aminoácidos que atuam em diferentes vias, como ciclo da ureia, ciclo do ácido tricarboxílico e síntese de poliaminas (Lykins *et al.*, 2018). C2, C4 e C9 foram as chalconas que apresentaram maior pontuação de Potencial Linear por Partes (ChemPLP), o que sugere uma especificidade significativa com o sítio do parasito e, consequentemente, maior efeito antiparasitário (dados não publicados).

Em relação aos ensaios com células BeWo, nosso estudo demonstrou que doses não citotóxicas de C2, C4 e C9 foram capazes de controlar a proliferação intracelular de *T. gondii*. Com base nos cálculos de IC₅₀, CC₅₀ e SI, observamos que C9 apresentou o maior potencial terapêutico, pelo maior valor de SI (4,77). Além disso, constatou-se que as chalconas mantiveram sua capacidade de restringir o crescimento de *T. gondii*, mesmo após a remoção do tratamento, sugerindo um dano irreversível, pelo menos após 24h, à biologia do parasito.

T. gondii invade as células hospedeiras através de um mecanismo especializado de invasão mediado por estruturas do complexo apical, que incluem as roptrias, os

micronemas e os grânulos densos (Dubremetz *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2019). As roptrias e micronemas secretam proteínas essenciais para a adesão e penetração do parasito na célula hospedeira, culminando na formação do vacúolo parasitóforo (Hunter e Sibley, 2012). A importância dessas estruturas é enorme, já que permitem que o parasito invada e se replique no interior das células, perpetuando a infecção e contribuindo para a patogênese da toxoplasmose. Para avaliar se as chalconas seriam capazes de impactar essas etapas iniciais da infecção, realizamos ensaios com parasitos pré-tratados com chalconas. O pré-tratamento dos taquizoítos por 1 h com C4 e C9, mas não com C2, reduziu o número total de parasitos aderidos às células, bem como o número de células com parasitos aderidos. Além disso, todas as chalconas testadas inibiram a invasão e posterior proliferação deste parasito.

Na sequência, estávamos interessados em investigar o possível efeito direto das chalconas na ultraestrutura parasitária. Portanto, foi realizada uma microscopia eletrônica de varredura (MEV) e uma microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os danos causados pelo tratamento de 24 horas com C4 e C9 foram confirmados por imagens TEM que mostraram a formação de estruturas semelhantes a vacúolos dentro dos parasitos e circundando o vacúolo parasitóforo. Parasitos intracelulares tratados com C9 exibiram danos mais significativos, com maior número qualitativo de estruturas semelhantes a vacúolos e ruptura de organelas. Além disso, a MEV demonstrou comprometimento significativo nas superfícies de *T. gondii* quando taquizoítos pré-tratados com C2, C4 e C9 apresentaram superfície rugosa irregular, ruptura da membrana plasmática com estruturas semelhantes a buracos, torção e alterações substanciais em sua forma característica. Este fenômeno pode estar associado ao efeito antiparasitário irreversível desses compostos. Apesar de ter promovido uma regulação negativa significativa na replicação de *T. gondii*, C2 foi a molécula que induziu menos alterações ultraestruturais no parasito. É possível especular que C2 possa prejudicar funções essenciais do parasito que não são detectáveis em ensaios focados em aspectos morfológicos. Experimentos adicionais são necessários para elucidar seu preciso mecanismo de ação.

Contribuindo para nossos achados, a literatura atual já relatou atividade semelhante de chalconas sintéticas em outros protozoários. De Mello *et al.* (2016) notaram diversas alterações ultraestruturais e morfológicas em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, como mudança significativa na ultraestrutura mitocondrial, além de vacuolização e condensação citoplasmática, encolhimento celular e formato arredondado

dos parasitos (Mello, de *et al.*, 2016). Além disso, Alonso *et al.* (2020) descobriram que um novo derivado de chalcona demonstrou atividade contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* alterando a fluidez da membrana do parasito (Alonso *et al.*, 2020). Quanto a *T. gondii* foi reportado que composto derivado da família dos flavonóides desencadeou mudança conformacional no tamanho e formato dos taquizoítos, que apresentaram depressões em sua superfície (Si *et al.*, 2018).

A infecção por *T. gondii* pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo hospedeiro. Durante a infecção, as células fagocíticas do hospedeiro geram EROs como mecanismo de defesa para destruir o parasito (Zhu *et al.*, 2019). No entanto, *T. gondii* desenvolveu estratégias para evadir essas defesas, incluindo a produção de suas próprias enzimas antioxidantes, como as peroxirredoxinas citosólicas TgPRX1 e TgPRX2 e a peroxirredoxina mitocondrial TgPRX3, superóxido dismutases TgSOD2 e TgSOD3, antioxidante glutathiona-S-transferase (TgGST), glutaredoxina (TgGrx) e catalase (Kwok *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2019). Embora a produção de EROs desempenhe um papel crucial no controle de infecções, a sua regulação inadequada pode levar a danos e inflamação nos tecidos. Para investigar se as chalconas poderiam modular a produção de EROs em células BeWo, medimos sua liberação em sobrenadantes de células submetidas a diferentes condições experimentais. Observou-se que a infecção induziu um potente aumento nos níveis de EROs, independentemente da presença de chalconas. No entanto, C9 foi capaz de diminuir esses níveis induzidos pela infecção. Assim, é possível concluir que apenas C9 foi capaz de modular a produção de EROs por células BeWo.

As citocinas também são mediadores importantes no controle da infecção por *T. gondii* nas células trofoblásticas (Barbosa *et al.*, 2014, 2015; Milian *et al.*, 2019; Souza, de *et al.*, 2021). Nesse sentido, medimos a liberação de citocinas nos sobrenadantes de células BeWo como um mecanismo adicional para explicar a ação anti-*T. gondii* mediada por chalconas. Como resultado, detectamos que C2, C4 e C9 não alteraram significativamente os níveis de IL-6 nas células BeWo infectadas, embora esta citocina seja considerada uma molécula importante para o controle de *T. gondii* no ambiente placentário (Castro-Filice *et al.*, 2014; Silva, da *et al.*, 2017; Souza, de *et al.*, 2023; Teixeira *et al.*, 2020). Em relação à produção de MIF é importante destacar que o próprio parasito produz uma molécula estruturalmente semelhante ao MIF humano que se liga ao mesmo receptor e recruta células do sistema imunológico estimulando-as a produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-8 e IL-12. Embora aparentemente contraditório, estudos demonstraram que *T. gondii*

pode utilizar isto como ferramenta para infectar células imunes e disseminar ainda mais a infecção (Ghosh *et al.*, 2019; Harker, Ueno e Lodoen, 2015; Sommerville *et al.*, 2013). Concordantemente, nossos dados demonstraram um aumento na secreção de MIF em todas as condições infectadas. Por outro lado, as células infectadas tratadas com o tratamento convencional ou com C4, regularam negativamente a liberação de MIF em comparação ao grupo não tratado, demonstrando um possível mecanismo regulatório para conter a propagação da infecção.

Em relação à IL-8, C2 e C4 foram potentes indutores da liberação desta citocina na ausência e na presença de infecção. O papel da IL-8 durante a infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal ainda não é muito claro. Nejad *et al.* (2011) detectaram níveis elevados de IL-8 em gestantes com taxas elevadas de IgM, caracterizando uma infecção aguda (Nejad *et al.*, 2011). Como mencionado acima, a IL-8 tem sido associada como uma molécula importante para a ativação de mecanismos celulares que ajudam na disseminação do parasito no hospedeiro (Sommerville *et al.*, 2013). Em concordância com essas informações, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram uma relação entre o aumento de IL-8 com o favorecimento do crescimento de *T. gondii* em trofoblastos e monócitos humanos (Milian *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2019). Portanto, não podemos associar os altos níveis de IL-8 ao controle do parasito em células BeWo. Provavelmente, os mecanismos acionados pelas chalconas para atingir esse controle impediram a proliferação do parasito mesmo na presença de níveis elevados de IL-8.

Para complementar nossos achados *in vitro*, também testamos o efeito anti-*T. gondii* de chalconas em explantes de vilosidades humanas de terceiro trimestre gestacional. De forma semelhante às células BeWo, nossos experimentos demonstraram que C2, C4 e C9 foram capazes de controlar a proliferação intracelular de *T. gondii* em doses não tóxicas para os explantes. Com base nos ensaios de MTT, LDH, análise morfológica e proliferação por β -galactosidase, selecionamos os explantes tratados com 64 μ g/mL das chalconas para analisar o perfil de citocinas. Verificou-se que todas as chalconas testadas não modificaram a produção de MIF, mas regularam negativamente os níveis de TNF- α . Estudos anteriores já comprovaram o papel do TNF- α na resposta imune contra *T. gondii*. Acredita-se que esta citocina atue sinergicamente com o IFN- γ para melhorar a atividade dos macrófagos na inibição da proliferação do *T. gondii* (Chang, Grau e Pechère, 1990). Além disso, foi relatado que níveis elevados de TNF- α foram associados ao aumento de proteínas inflamatórias na fase aguda da toxoplasmose em camundongos, necessárias para a defesa

contra a infecção (Atmaca e Atmaca, 2022). Estudos anteriores do nosso grupo também relataram o importante papel do TNF na redução da infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas humanas e explantes de vilosidades (Barbosa *et al.*, 2015; Souza, de *et al.*, 2023). Embora níveis adequados de TNF- α desempenhem um papel crucial no controle da infecção, ativando células imunológicas e promovendo a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, a produção excessiva desta citocina pode causar danos significativos às células hospedeiras. Onda *et al.* (2015) relataram que a modulação negativa do TNF em células trofoblásticas primárias estava associada ao controle da patogênese da pré-eclâmpsia (Onda *et al.*, 2015).

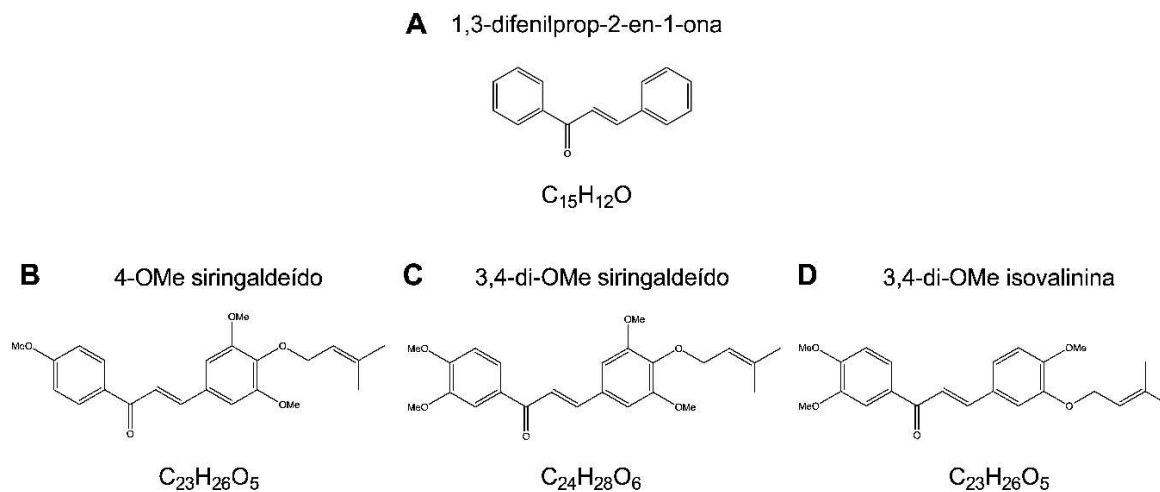
A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação grave da gravidez caracterizada principalmente, pela hipertensão. Um desequilíbrio entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos pode desencadear disfunção endotelial e representa um ponto-chave no mecanismo dessa condição (Steegers *et al.*, 2010). Curiosamente, Sofalcone, uma chalcona 20-carboximetoxi-4,4-bis(3-metil-2-buteniloxi), induziu a redução da proteína antiangiogênica (sFlt-1) em trofoblastos primários humanos e reduziram o TNF, uma das citocinas mais importantes envolvidas na patogênese da PE. Os autores concluíram que as chalconas foram importantes para manter uma gravidez bem-sucedida e podem ser um bom alvo para o tratamento da PE por melhorar a angiogênese e modular negativamente a produção de TNF (Onda *et al.*, 2015; Steegers *et al.*, 2010). Nesse sentido, levantamos a hipótese de que as chalconas modulam a produção de TNF- α pelas vilosidades infectadas em relação ao grupo controle infectado/não tratado para evitar danos ao tecido, ao mesmo tempo que manteve esta citocina em níveis eficazes para combater a propagação da infecção.

8. CONCLUSÃO

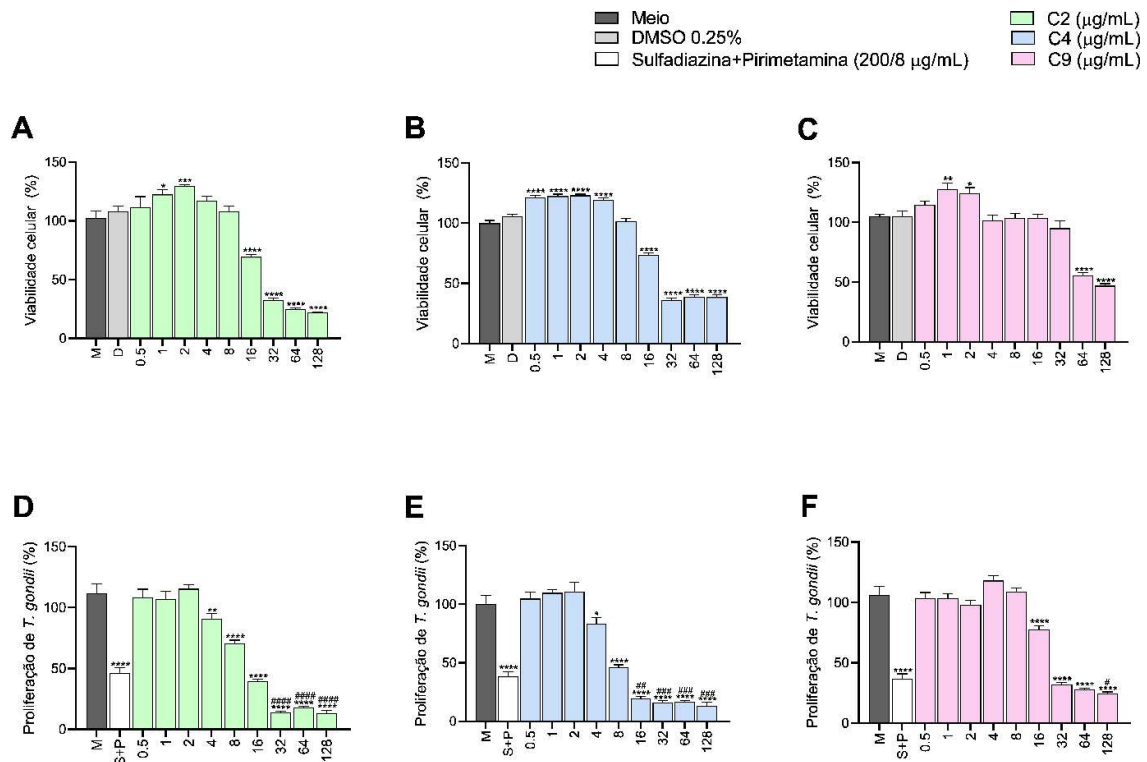
Em conclusão, nossos resultados demonstraram que as chalconas C2, C4 e C9 foram capazes de controlar a infecção por *T. gondii* em modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo* de interface materno-fetal humana com baixa toxicidade. Supomos que o efeito anti-*T. gondii* irreversível promovido por esses compostos está relacionado à imunomodulação exibida em explantes humanos e, principalmente, através do efeito direto sobre os parasitos. Juntando essas descobertas, fornecemos fortes evidências científicas do potencial uso de C2, C4 e C9 como tratamentos alternativos para a toxoplasmose congênita, bem como as chalconas como fonte promissora para o desenvolvimento de novas moléculas anti-*T. gondii*.

9. FIGURAS

Figura 3: Estruturas químicas de chalcona e derivados.



Fonte: O próprio autor. Estruturas químicas de: (A) chalcona sem modificação estrutural, (B) C2, (C) C4 e (D) C9.

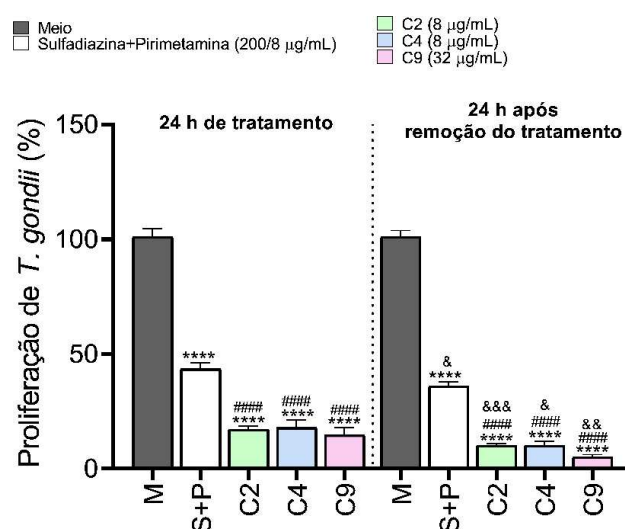
Figura 4: Ensaios de viabilidade celular e proliferação intracelular de *T. gondii*.

Fonte: O próprio autor. **A-C:** células BeWo tratadas com diferentes concentrações de C2 (**A**), C4 (**B**) e C9 (**C**) (0,5–128 µg/mL) para análise de viabilidade celular (ensaio colorimétrico MTT). Como controle negativo (100% de viabilidade) as células foram tratadas apenas com meio de cultura (M), e como controle de veículo com DMSO 0,25% (D). A viabilidade celular foi expressa em percentagens (% de viabilidade celular). **D-F:** ensaios colorimétricos de β-galactosidase foram realizados para quantificar a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo infectadas e tratadas com as mesmas concentrações mencionadas acima (0,5–128 µg/mL). Como controle negativo (100% de proliferação de *T. gondii*) células infectadas foram tratadas apenas com meio de cultura (M), e como controle positivo com uma combinação de 200 µg/mL de sulfadiazina e 8 µg/mL de pirimetamina (S+P). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi expressa em percentagens (% de proliferação de *T. gondii*). **A-C:** *Comparação entre células não tratadas e tratadas. **D-F:** *Comparação entre células infectadas/tratadas e infectadas/não tratadas; #Comparação entre células infectadas/tratadas e S+P/infectadas. Os dados são apresentados como médias ± SEM de três experimentos independentes realizados em oito replicatas. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram detectadas por ANOVA One-Way com pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Tabela 1: Dados de CC₅₀, IC₅₀ e SI.

	Compostos	Nomenclatura	CC ₅₀	IC ₅₀	SI
1	4-OMe siringaldeído	C2	23,4 ug/mL ± 5,63	17,91 ug/mL ± 0,44	1,30
2	3,4-di-OMe siringaldeído	C4	38,03 ug/mL ± 4,91	9,81 ug/mL ± 3,01	3,87
3	3,4-di-OMe isovanilina	C9	131,88 ug/mL ± 14,92	27,59 ug/mL ± 10,87	4,77

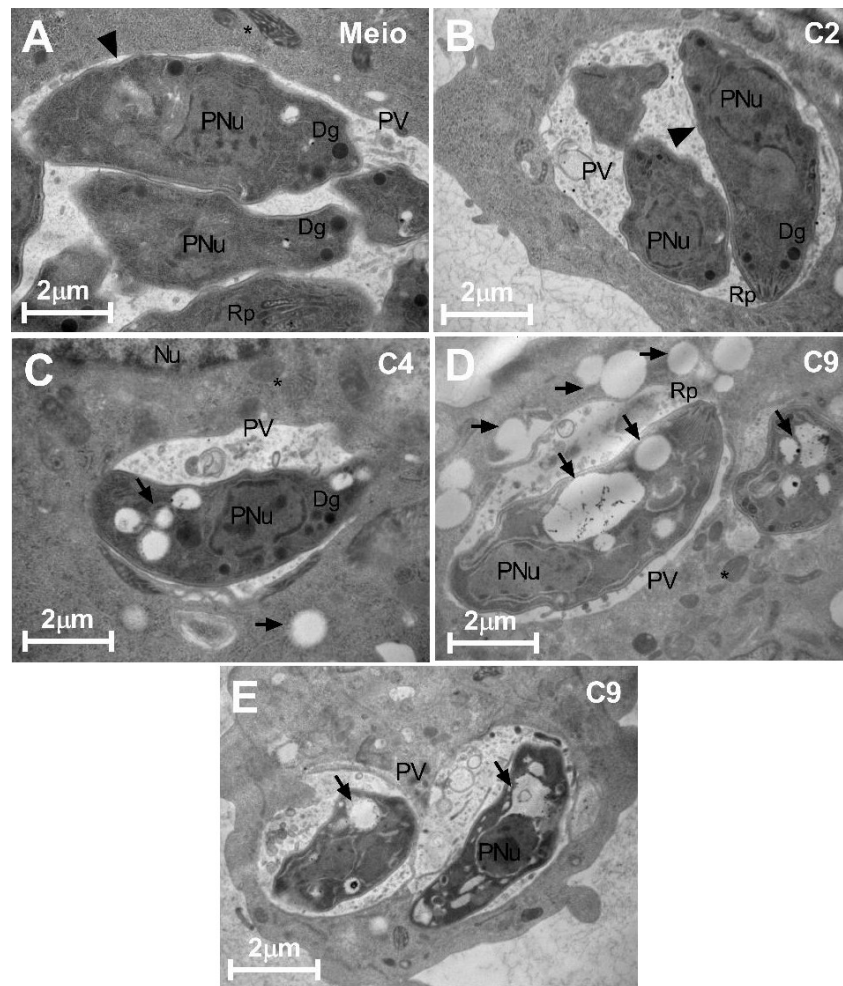
Fonte: O próprio autor. Dados resumidos de CC₅₀ (metade da concentração citotóxica máxima), IC₅₀ (metade da concentração inibitória máxima sobre o crescimento do parasito) e SI (índice de seletividade: razão entre CC₅₀ e IC₅₀) obtidos de derivados de chalconas.

Figura 5: Ensaio de reversibilidade.

Fonte: O próprio autor. Células BeWo infectadas foram expostas a C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL), S+P (200+8 µg/mL) ou apenas meio de cultura (M) por 24 h, seguido ou não de remoção do tratamento por mais 24 horas. O ensaio de β-galactosidase foi realizado e a proliferação intracelular de *T. gondii* foi expressa em porcentagens (% de proliferação de *T. gondii*). A reversibilidade do tratamento foi deliberada comparando as condições de 24 horas de tratamento com as 24 horas após a remoção do tratamento. O grupo controle negativo (M) foi considerado 100% reversível. Os dados são expressos como médias ± SEM de três experimentos realizados em oito replicatas. (*) Comparações entre células infectadas/não tratadas e infectadas/tratadas; (#) entre

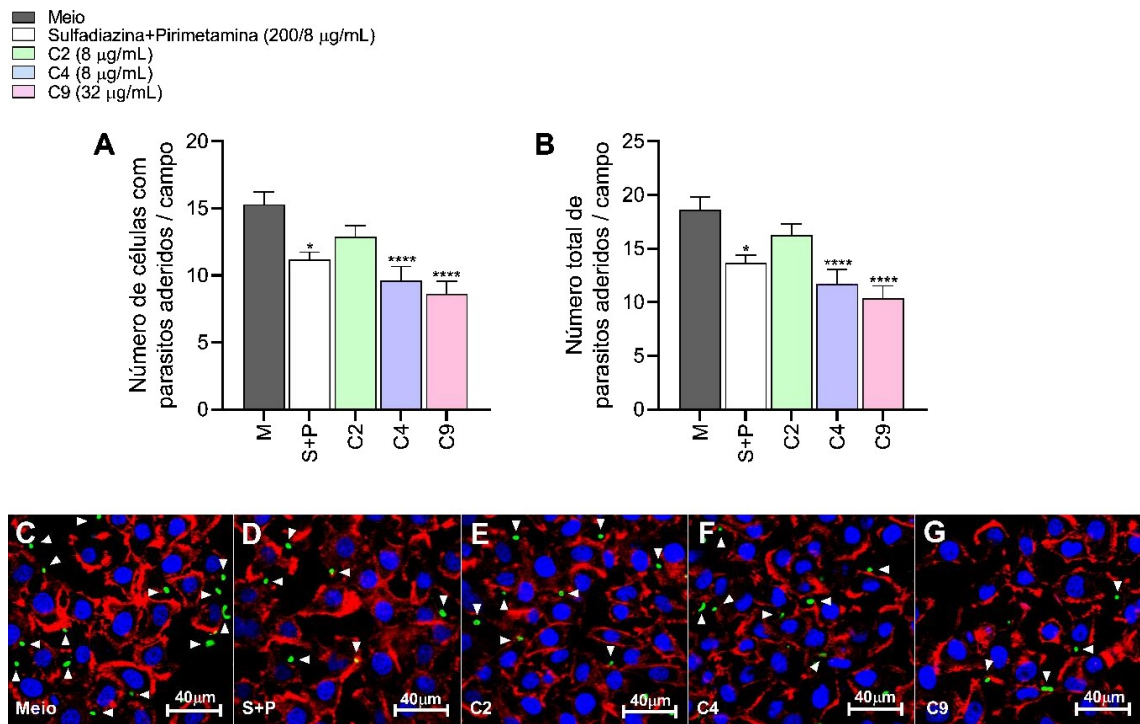
células tratadas com S+P e chalconas; e (&) entre células infectadas/tratadas 24 horas após o tratamento e células infectadas/tratadas 24 horas após a remoção do tratamento. Diferenças significativas foram analisadas usando (*;#) One-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Dunnett e (&) teste *t* Student (two-fold). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Figura 6: Análises ultraestruturais de *T. gondii* na presença de chalconas



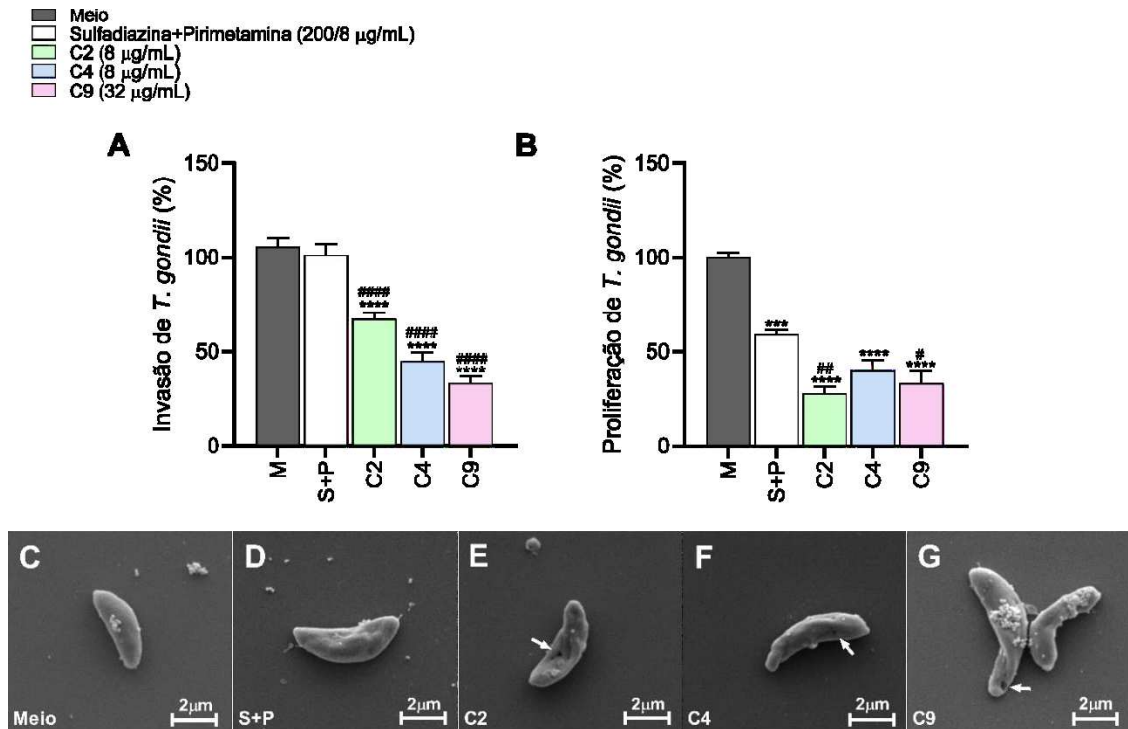
Fonte: O próprio autor. Células BeWo foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* e tratadas por 24 h com C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL) ou apenas meio de cultura e submetidas à microscopia eletrônica de transmissão. Micrografias eletrônicas representativas mostrando taquizoítos no interior de células infectadas/não tratadas (A); infectadas/tratadas com C2 (B); infectadas/tratadas com C4 (C) ou infectadas/tratadas com C9 (D, E). **Ponta de seta:** membrana dupla do parasito. **Setas pretas:** VLS (estruturas semelhantes a vacúolos). **Asteriscos:** mitocôndrias da célula hospedeira. **Dg:** grânulos densos. **Nu:** núcleo da célula hospedeira. **Rp:** roptrias. **Pnu:** núcleo do parasito; **PV:** vacúolo parasitóforo. Barras de escala (canto inferior esquerdo) 2 µm.

Figura 7: Adesão de parasitos pré-tratados com chalconas.



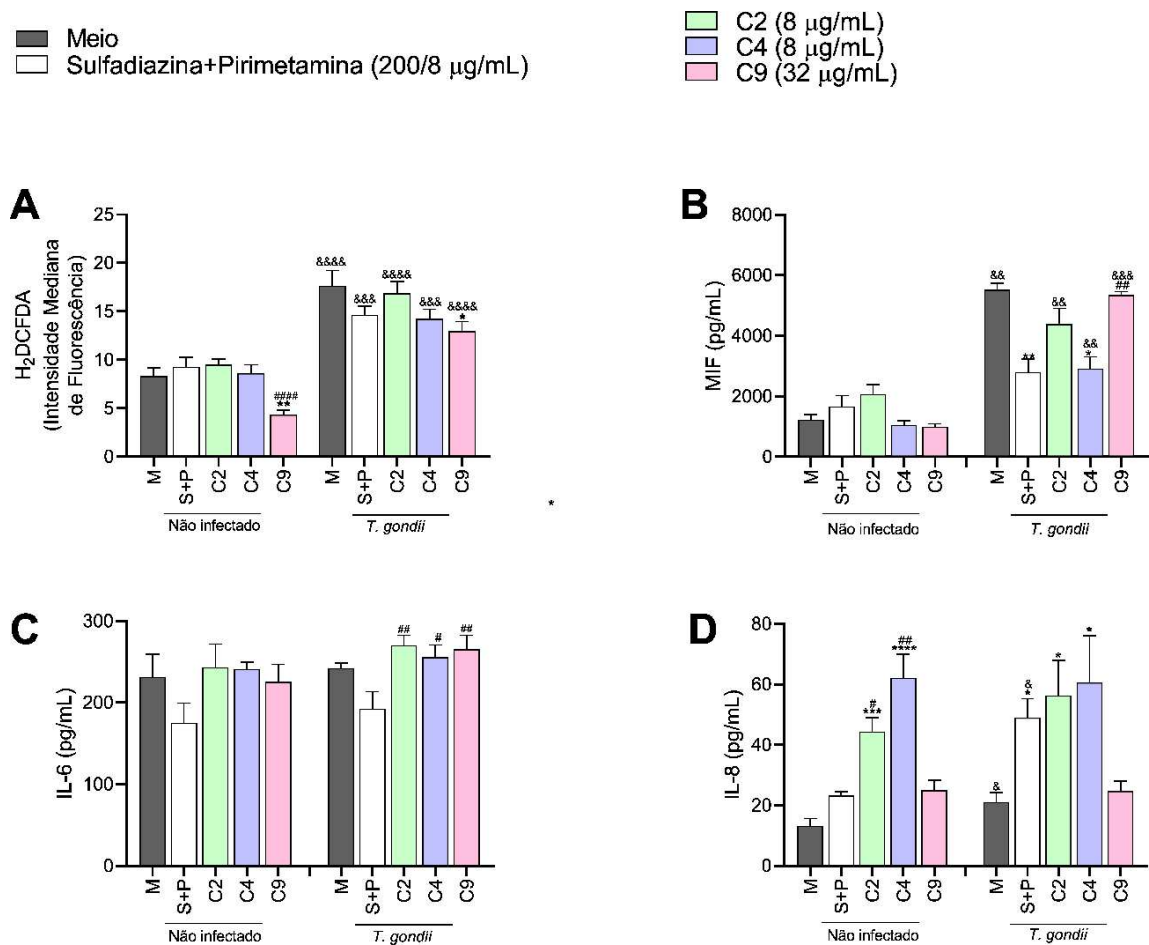
Fonte: O próprio autor. Taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 h com C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL), S+P (200+8 µg/mL) ou apenas meio de cultura (M) antes de aderir em células BeWo previamente fixadas por 3 h. Células e parasitos foram fixados e marcados com DAPI (núcleos - azul), Phalloidin-Atto 565 (F-actina - vermelho) e IgG anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (taquizoítos - verde). As imagens foram capturadas usando microscopia confocal e aproximadamente 20 campos foram examinados aleatoriamente para obter: **A:** o número de células com parasitos aderidos. **B:** número total de parasitos aderidos por talhão analisado. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Imagens representativas destacando a interação taquizoítos-células hospedeiras nas diferentes condições experimentais, como segue: **(C)** parasitos não tratados, **(D)** parasitos pré-tratados com S+P e **(E, F, G)** parasitos pré-tratados com C2, C4 e C9, respectivamente. Os dados são expressos como médias $\pm$ SEM de dois experimentos independentes realizados em quatro replicatas. *Comparação entre células infectadas/não tratadas e infectadas/tratadas. #Comparação com células tratadas com S+P. Barra de escala: 40 µm. Os taquizoítos foram indicados por pontas de setas brancas.

Figura 8: Parasitos pré-tratados com chalconas.



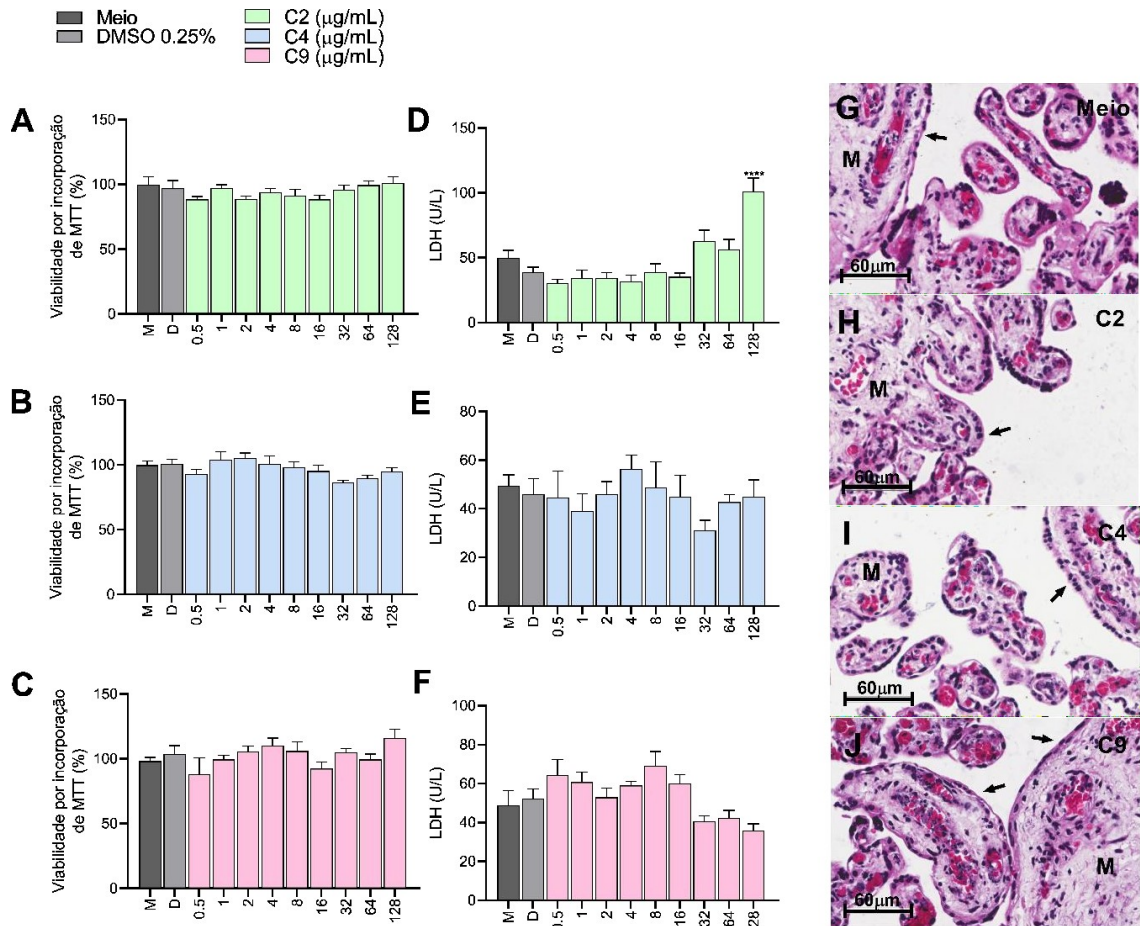
Fonte: O próprio autor. Um pré-tratamento foi realizado incubando taquizoítos de *T. gondii* com C2 (8 $\mu\text{g/mL}$), C4 (8 $\mu\text{g/mL}$), C9 (32 $\mu\text{g/mL}$), S+P (200+8 $\mu\text{g/mL}$) ou apenas meio de cultura (M) por 1 h. **A:** O ensaio de β -galactosidase foi realizado 3 horas depois e a invasão de *T. gondii* foi expressa em porcentagens (% de invasão de *T. gondii*). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram analisadas utilizando One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. **B:** O ensaio de β -galactosidase foi realizado 24 horas depois e a proliferação de *T. gondii* foi expressa em porcentagens (% de proliferação de *T. gondii*). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Os parasitas não tratados representam o controle negativo e foram considerados como 100% de invasão e proliferação, respectivamente. Os dados são expressos como médias $\pm$ SEM de três experimentos realizados em oito replicatas. *Comparação entre células não tratadas/infectadas e células infectadas/tratadas. #Comparação com células tratadas com S+P. Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando **(C)**: taquizoíto de *T. gondii* não tratado; **(D)**: taquizoíto pré-tratado com S+P (200 + 8 $\mu\text{g/mL}$); **(E)**: C2 (8 $\mu\text{g/mL}$); **(F)**: C4 (8 $\mu\text{g/mL}$) e **(G)**: C9 (32 $\mu\text{g/mL}$). Barras de escala (canto inferior direito) 2 μm . A perda da integridade da superfície do taquizoíto ou de estruturas semelhantes a buracos foi indicada por setas brancas.

Figura 9: Produção de EROs e citocinas em células BeWo tratadas com chalconas.



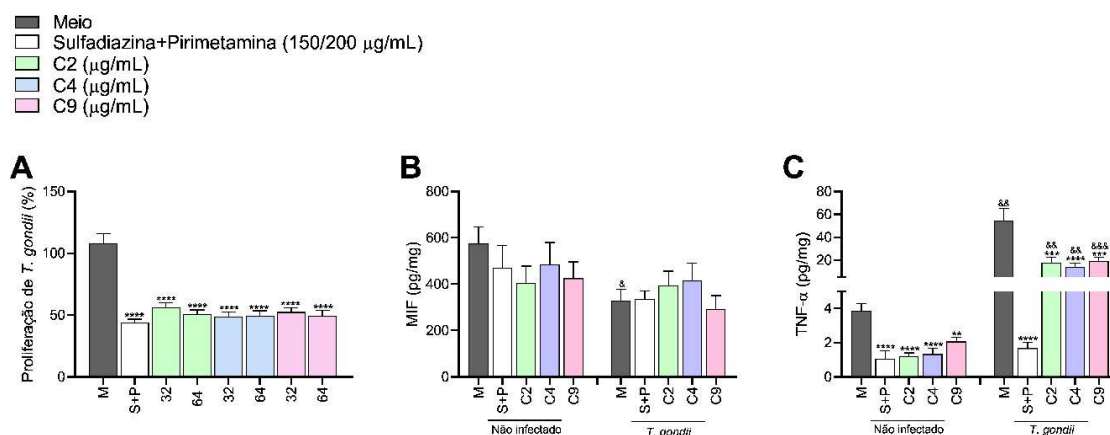
Fonte: O próprio autor. Células BeWo foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii*, seguidas de tratamento com C2 (8 µg/mL), C4 (8 µg/mL), C9 (32 µg/mL), S+P (200+8 µg/mL) ou apenas meio de cultura (M) por 24 h. **A:** As células BeWo foram incubadas com a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) e a produção de EROs foi medida por fluorescência usando um espectrofotômetro. Os dados foram expressos como IMF. Após os tratamentos, os sobrenadantes foram coletados para mensuração de **(B)** MIF, **(C)** IL-6 e **(D)** IL-8. Os dados são expressos como médias ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em doze replicatas. *Comparação entre células não tratadas e tratadas. #Comparação entre células tratadas com S+P e chalconas. &Comparação entre células infectadas/tratadas com seus respectivos controles na ausência de infecção. **A, C:** diferenças significativas (P<0,05) foram analisadas usando (*, #) One-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Dunnett e (&) teste *t*-Student não pareado (two-fold). **B, D:** diferenças significativas foram analisadas usando (*, #) teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn e (&) teste de Mann-Whitney (two-fold);

Figura 10: Ensaios de viabilidade tecidual em explantes de vilosidades coriônicas humanas tratados com chalconas.



Fonte: O próprio autor. Explantes vilosos foram tratados por 24 horas com diferentes concentrações de C2, C4 e C9 (0,5–128 $\mu\text{g/mL}$) para análise de viabilidade tecidual. Paralelamente, os tecidos também foram tratados apenas com meio de cultura (M), representando o controle negativo (100% de viabilidade) e com DMSO 0,25% (D), representando o controle veículo. **A, B, C:** O ensaio colorimétrico de MTT foi realizado e expresso em porcentagens (% de viabilidade pela incorporação do MTT). **D, E, F:** os sobrenadantes foram coletados e usados para medir os níveis de LDH (U/L). Dados expressos em médias $\pm$ SEM de um experimento realizado em oito replicatas. *Comparação entre vilosidades não tratadas e tratadas. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram determinadas usando One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. Fotomicrografias representativas de secções histológicas coradas com HE de vilosidades incubadas com meio de cultura (**G**), C2 (**H**), C4 (**I**) e C9 (**J**) (todos 64 $\mu\text{g/mL}$). Sinciciotrofoblasto está indicado por setas pretas e o mesênquima pela letra M. Barra de escala: 60 μm .

Figura 11: Proliferação intracelular de *T. gondii* e produção de citocinas em explantes de vilosidades humanas tratadas com chalconas.



Fonte: O próprio autor. **A:** Explantes vilosos foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* e tratados com C2, C4, C9 (32 e 64 µg/mL), S+P (150+200 µg/mL, respectivamente) ou apenas meio de cultura (M) por 24 h. As porcentagens de proliferação intracelular de *T. gondii* foram medidas pelo ensaio de β-galactosidase e comparadas com explantes infectados/não tratados (M), considerados como 100% de proliferação, e com o controle positivo (S+P). **B, C:** Após os tratamentos, os sobrenadantes foram coletados para mensuração de **(B)** MIF e **(C)** TNF-α. Os níveis de citocinas foram expressos em pg/mg de tecido. Os dados são expressos como médias ± SEM de três experimentos independentes realizados em oito replicatas. *Comparação entre vilosidades não tratadas e tratadas. #Comparação com vilosidades tratadas com S+P. &Comparação entre explantes não infectados/tratados e infectados/tratados. Diferenças significativas foram analisadas usando (*, #) One-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Dunnett e (&) teste *t*-Student não pareado (two-fold). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

10. REFERÊNCIAS

- ABU-RAYA, B. *et al.* Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. **Frontiers in immunology**, v. 11, 7 out. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575197>
- AGUIRRE, A. A. *et al.* The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. **Ecohealth**, v. 16, n. 2, p. 378, 15 jun. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>
- AHMED, M.; SOOD, A.; GUPTA, J. Toxoplasmosis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 255, p. 44–50, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.10.003>
- ALONSO, L. *et al.* Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, p. 105407, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105407>
- ARAÚJO, T. E. DE *et al.* Experimental models of maternal-fetal interface and their potential use for nanotechnology applications. **Cell biology international**, v. 44, n. 1, p. 36–50, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1002/cbin.11222>

ARORA, N. *et al.* Microbial vertical transmission during human pregnancy. **Cell host & microbe**, v. 21, n. 5, p. 561, 5 maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>

ASPINALL, T. V. *et al.* The Molecular Basis of Sulfonamide Resistance in *Toxoplasma gondii* and Implications for the Clinical Management of Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 11, p. 1637–1643, 1 jun. 2002. <https://doi.org/10.1086/340577>

ATMACA, N.; ATMACA, H. T. The correlation of TNF alpha levels with acute phase proteins in acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 239, p. 108311, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108311>

BARBOSA, B. F. *et al.* BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, n. 3, p. 536–545, 24 jan. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03583.x>

BARBOSA, B.F. *et al.* Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, n. 3, p. 152–162, mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.013>

BARBOSA, B. F. *et al.* IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 3, p. 82, 1 mar. 2015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>

BEN-HARARI, R. R.; GOODWIN, E.; CASOY, J. Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review. **Drugs in R and D**, v. 17, n. 4, p. 523–544, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1007/s40268-017-0206-8>

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607–623, set. 2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology** 2007 6:1, v. 6, n. 1, p. 79–88, jan. 2008. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1663, p. 20140066, 3 mar. 2015. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>

CARELLOS, E. V. M. *et al.* Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease? **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 3, p. 644, 1 mar. 2014. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001507>

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83–89, fev. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>

CASTRO-FILICE, L. S. *et al.* Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 132, 19 maio 2014. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-132>

CHANG, H. R.; GRAU, G. E.; PECHÈRE, J. C. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. **Immunology**, v. 69, n. 1, p. 33, jan. 1990.

- COSTA, M. S. *et al.* Increased ROS generation causes apoptosis-like death: Mechanistic insights into the anti-Leishmania activity of a potent ruthenium(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 1–12, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.005>
- CUELLAR, J. E. *et al.* Coumaro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania and trypanosomiasis. **Heliyon**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08939>
- DEKEL, N. *et al.* Inflammation and implantation. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 63, n. 1, p. 17–21, jan. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00792.x>
- DOLIWA, C. *et al.* Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression or polymorphisms in genes of therapeutic targets and ABC transporters. **Parasite**, v. 20, n. 1, p. 19, 2013. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013020>
- 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, set. 2012. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>
- DUBEY, J.P. *et al.* Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. **Parasitology**, v. 148, n. 12, 2021.
- DUBREMETZ, J. F. *et al.* Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1007–1013, 1 jul. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00076-9)
- DUNAY, I. R. *et al.* Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-17>
- ELAZAB, S. T.; ARAFA, F. M. Anti-Toxoplasma Activities of Some Egyptian Plant Extracts: An In Vitro Study. **Acta Parasitologica**, v. 67, n. 4, p. 1800, 1 dez. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00633-2>
- ESPINOZA-HICKS, J. C. *et al.* Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European journal of medicinal chemistry**, v. 167, p. 402–413, 1 abr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.028>
- FALLAHI, S. *et al.* An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 47, n. 3, p. 133–140, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2017.12.003>
- FERNÁNDEZ-ESCOBAR, M. *et al.* *Toxoplasma gondii* Genotyping: A Closer Look Into Europe. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 23 mar. 2022. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.842595>
- FLEGR, J. *et al.* Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90203, 24 mar. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>
- FRANCO, P. S. *et al.* Brazilian strains of *Toxoplasma gondii* are controlled by azithromycin and modulate cytokine production in human placental explants. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 10, 21 jan. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0503-3>
- GHOSH, S. *et al.* Parasite-Produced MIF Cytokine: Role in Immune Evasion, Invasion, and Pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. aug, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01995>

- GONZÁLEZ, L. A. *et al.* Effect of substituents in the A and B rings of chalcones on antiparasite activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 12, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000157>
- GUBBELS, M. J.; DURASINGH, M. T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **International journal for parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1071, nov. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.009>
- HARKER, K. S.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite immunology**, v. 37, n. 3, p. 141–149, 1 mar. 2015. <https://doi.org/10.1111/pim.12163>
- HORII, M. *et al.* Modeling human trophoblast, the placental epithelium at the maternal fetal interface. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 160, n. 1, p. R1, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0428>
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561–1566, 1995. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766, nov. 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>
- I. VILLENA, D. A. B. L. D. Pyrimethamine-sulfadoxine Treatment of Congenital Toxoplasmosis: Follow-up of 78 Cases Between 1980 and 1997. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 295–300, 8 jan. 1998. <https://doi.org/10.1080/00365549850160963>
- JIANG, L. *et al.* Discovery and evaluation of chalcone derivatives as novel potential anti-*Toxoplasma gondii* agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 234, 15 abr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114244>
- KEELEY, A.; SOLDATI, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 10, p. 528–532, 1 out. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.08.002>
- KHAN, A. *et al.* Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645, maio 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.005>
- KHAN, S. A.; ASIRI, A. M. Green synthesis, characterization and biological evaluation of novel chalcones as anti bacterial agents. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2890–S2895, maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.11.018>
- KIAN, D. *et al.* Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 103, p. 1294–1301, 1 jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.164>
- KODJIKIAN, L. *et al.* Vertical Transmission of Toxoplasmosis from a Chronically Infected Immunocompetent Woman. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, n. 3, p. 272–274, mar. 2004. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000115949.12206.69>
- KWOK, L. Y. *et al.* The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 47–61, 1 jan. 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03823.x>
- LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 65, n. 12, p. 1900, jun. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7556-x>

- LIU, X. *et al.* Exploring maternal-fetal interface with in vitro placental and trophoblastic models. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1279227, 14 nov. 2023. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1279227>
- LI, X. *et al.* Pregnancy immune tolerance at the maternal-fetal interface. **International Reviews of Immunology**, v. 39, n. 6, p. 247–263, 2020. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1777292>
- LI, X.-L. *et al.* A Meta Analysis on Risks of Adverse Pregnancy Outcomes in *Toxoplasma gondii* Infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97775, 15 maio 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097775>
- LOPES, C. S. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865–1875, 1 jul. 2016. <https://doi.org/10.1017/S0950268815003295>
- LUCAS, L. A. *et al.* Antiparasitic Properties of Propolis Extracts and Their Compounds. **Chemistry & biodiversity**, v. 18, n. 9, 1 set. 2021. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100310>
- MAMEDE, L. *et al.* Natural Phenolic Compounds and Derivatives as Potential Antimalarial Agents. **Planta medica**, v. 86, n. 9, p. 585–618, 1 jun. 2020. <https://doi.org/10.1055/a-1148-9000>
- MARTÍNEZ, A. F. F. *et al.* Leaf hydroalcoholic extract and oleoresin from *Copaifera multijuga* control *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and placental explants from third-trimester pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 109, 13 fev. 2023. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1113896>
- MELLO, T. F. P. DE *et al.* Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* treated with synthetic chalcones. **Experimental Parasitology**, v. 160, p. 23–30, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.11.005>
- MELO FERNANDES, T. A. DE *et al.* BjusssuLAAO-II, an L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom, impairs *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and villous explants from the third trimester of pregnancy. **Microbes and Infection**, p. 105123, 2 mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105123>
- MILIAN, I. C. B. *et al.* Increased *Toxoplasma gondii* intracellular proliferation in human extravillous trophoblast cells (HTR8/SVneo Line) is sequentially triggered by MIF, ERK1/2, and COX-2. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. apr, p. 455567, 24 abr. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00852>
- MILLER, C. M. *et al.* The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23–39, 1 jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>
- MILLER, R. K. *et al.* Human placental explants in culture: Approaches and assessments. **Placenta**, v. 26, n. 6, p. 439–448, 1 jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2005.06.006>
- MILNE, G.; WEBSTER, J. P.; WALKER, M. *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? **Trends in Parasitology**, v. 36, p. 959–969, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.005>
- MONCADA, P. A.; MONTOYA, J. G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 7, p. 815–828, 10 jul. 2012. <https://doi.org/10.1586/eri.12.58>
- MONTAZERI, M. *et al.* Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2587, 29 mar. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02587>
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 12 jun. 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. 554–566, 15 ago. 2008. <https://doi.org/10.1086/590149>
- MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 63, n. 6, p. 425–433, jun. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- NEJAD, M. R. *et al.* The evaluation of interleukin-8 chemokine in chronic and acute *Toxoplasma gondii* infection. **Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench**, v. 4, n. 1, p. 34, 2011.
- NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 14, n. 12, p. 1669–1691, dez. 2004. <https://doi.org/10.1517/13543776.14.12.1669>
- OLIVEIRA, A. S. DE *et al.* Novel trypanocidal thiophen-chalcone cruzain inhibitors: structure- and ligand-based studies. **Future Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 795–808, jun. 2022. <https://doi.org/10.4155/fmc-2022-0013>
- OLIVEIRA GOMES, A. DE *et al.* Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 6, p. 2792–2801, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>
- OLIVEIRA, L. R. *et al.* Phenolic chalcones as agents against *Trichomonas vaginalis*. **Bioorganic Chemistry**, v. 141, p. 106888, 1 dez. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106888>
- ONDA, K. *et al.* Sofalcone upregulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/heme oxygenase-1 pathway, reduces soluble fms-like tyrosine kinase-1, and quenches endothelial dysfunction: potential therapeutic for preeclampsia. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 65, n. 4, p. 855–862, 20 abr. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12205-015-0454-5>
- OTUN, H. A. *et al.* Effect of tumour necrosis factor- α in combination with interferon- γ on first trimester extravillous trophoblast invasion. **Journal of reproductive immunology**, v. 88, n. 1, p. 1–11, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.10.003>
- PATTILLO, R.; RESEARCH, G. G.-C.; 1968, UNDEFINED. The Establishment of a Cell Line of Human Hormone-synthesizing Trophoblastic Cells in Vitro. **AACRRA Pattillo, GO GeyCancer research, 1968•AACR**, v. 28, p. 1231–1236, 1968.
- PENA, H. F. J. *et al.* Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–569, 1 abr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- 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, n. FEB, p. 440742, 12 fev. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00225>
- PEYRON, F. *et al.* Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005222, 16 fev. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005222>
- PORTES, J. DE A. *et al.* A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **Veterinary parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 261–269, 25 maio 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.008>

- REZAEI, F. *et al.* A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 172–184, 1 jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.003>
- REZENDE-OLIVEIRA, K. *et al.* Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. **Placenta**, v. 33, n. 9, p. 682–687, set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.013>
- ROBERT-GANGNEUX, F. *et al.* The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 12, p. 530–536, 1 dez. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.09.005>
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264, abr. 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- 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 & cell**, v. 78, 1 out. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101907>
- ROUGIER, S.; MONTOYA, J. G.; PEYRON, F. Lifelong Persistence of *Toxoplasma* Cysts: A Questionable Dogma? **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 93–101, 1 fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.007>
- RUDRAPAL, M. *et al.* Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7177, 26 nov. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26237177>
- SANTOS, A. T. L. DOS *et al.* Synthesis of chalcones and their antimicrobial and drug potentiating activities. **Microbial pathogenesis**, v. 180, 1 jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023>
- SATOKATA, A. A. C. *et al.* Chalcones with potential antibacterial and antibiofilm activities against periodontopathogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 76, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102588>
- SCHLÜTER, D. *et al.* Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 917–929, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>
- SI, H. *et al.* Licochalcone A: An effective and low-toxicity compound against *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 238–245, 1 ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.02.006>
- SILVA, L. A. *et al.* Genetic Polymorphisms and Phenotypic Profiles of Sulfadiazine-Resistant and Sensitive *Toxoplasma gondii* Isolates Obtained from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170689>
- SILVA, R. J. DA *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, n. jul, 26 jul. 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00340>
- SMITH, N. C. *et al.* Control of human toxoplasmosis. **International journal for parasitology**, v. 51, n. 2–3, p. 95–121, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001>
- SOMMERVILLE, C. *et al.* Biochemical and Immunological Characterization of *Toxoplasma gondii* Macrophage Migration Inhibitory Factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12733, 5 maio 2013. <https://doi.org/10.5465/ambpp.2013.12733abstract>

- SOTO-SÁNCHEZ, J. Bioactivity of Natural Polyphenols as Antiparasitic Agents and their Biochemical Targets. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 22, n. 20, p. 2661–2677, 5 abr. 2022. <https://doi.org/10.2174/1389557522666220404090429>
- SOUZA, G. DE *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, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.5465/AMBPP.2021.12709abstract>
- SOUZA, G. DA *et al.* *Trypanosoma cruzi* P21 recombinant protein modulates *Toxoplasma gondii* infection in different experimental models of the human maternal–fetal interface. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1243480, 16 out. 2023.
- STEEGERS, E. A. P. *et al.* Pre-eclampsia. **Lancet (London, England)**, v. 376, n. 9741, p. 631–644, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60279-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60279-6)
- STELZER, S. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>
- S. VAIDYA, S.; W. WALSH, S.; M. GERK, P. Application of human placental villous tissue explants to study ABC transporter mediated efflux of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 814–823, 26 abr. 2011. <https://doi.org/10.2174/138920111795470976>
- 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, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72230-0>
- TEIXEIRA, S. C.; ROSINI, A. M.; *et al.* Polyalthic acid and oleoresin from *Copaifera trapezifolia* Hayne reduce *Toxoplasma gondii* growth in human villous explants, even triggering an anti-inflammatory profile. **Experimental Parasitology**, v. 250, 1 jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108534>
- TEIXEIRA, S. C.; PASCHOALINO, M.; *et al.* Rottlerin impairs early and late steps of *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and villous explants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 384, p. 110716, 1 out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110716>
- TREIN, M. R. *et al.* Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of chalcone and amino-analogues. **Parasitology Research**, v. 118, n. 2, p. 607–615, 7 fev. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6164-4>
- TURCO, M. Y.; MOFFETT, A. Development of the human placenta. **Development (Cambridge)**, v. 146, n. 22, 15 nov. 2019. <https://doi.org/10.1242/dev.163428>
- VASCONCELOS-SANTOS, D. V. *et al.* Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil: Results of Early Ophthalmologic Examination of a Large Cohort of Neonates. **Ophthalmology**, v. 116, n. 11, p. 2199–2205.e1, 1 nov. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.04.042>
- WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 1 jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>
- XIAO, J. *et al.* Chalcone Derivatives and their Activities against Drug-resistant Cancers: An Overview. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 348–362, 10 mar. 2021. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201022143236>
- XIAO, Z. *et al.* Progress in deciphering trophoblast cell differentiation during human placentation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 67, p. 86–91, dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.010>

- XU, M. *et al.* Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, p. 103133, out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103133>
- YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology** **2014** **14:2**, v. 14, n. 2, p. 109–121, 24 jan. 2014. <https://doi.org/10.1038/nri3598>
- ZHEOAT, A. M. *et al.* Antitrypanosomal and Antileishmanial Activity of Chalcones and Flavanones from *Polygonum salicifolium*. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 2, p. 1–9, 5 fev. 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020175>
- ZHU, W. *et al.* Strategies developed by *Toxoplasma gondii* to survive in the host. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. apr, p. 441779, 26 abr. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00899>