

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIEL PEREIRA SOUSA

**CURCUMINÓIDES CONTROLAM A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (LINHAGEM BeWo)**

UBERLÂNDIA

2024

DANIEL PEREIRA SOUSA

**CURCUMINÓIDES CONTROLAM A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (LINHAGEM BeWo)**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Coorientadora: Marina Paschoalino

UBERLÂNDIA

2024

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

S725 2024	Sousa, Daniel Pereira, 1999- Curcuminóides controlam a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo)[recurso eletrônico] / Daniel Pereira Sousa. - 2024. Orientadora: Bellisa de Freitas Barbosa. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Ciências Biológicas. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Biologia. I. Barbosa, Bellisa de Freitas, 1983-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título. CDU: 573
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

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

DANIEL PEREIRA SOUSA

**CURCUMINÓIDES CONTROLAM A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (LINHAGEM BeWo)**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado
à Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial à obtenção
do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Data de aprovação: ____/____/____

Profª. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa
Universidade Federal de Uberlândia
Presidente

Dr. Marcos Paulo Oliveira Almeida
Universidade Federal de Uberlândia
Membro

Me. Natália Carine Lima dos Santos
Universidade Federal de Uberlândia
Membro

Dedico este trabalho ao porteiro e à faxineira que deram vida a este aspirante a cientista. Meu pai, Antônio, que acredita que mel com 'açafraão' é a cura para todos os males. Minha mãe, Maria Edileuza, cujo o abraço talvez seja. Amo-os profundamente.

*Em memória de meu irmão, Rafael.
Te amo para sempre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Uberlândia, pelo ensino público de qualidade. Pela assistência estudantil ímpar. Por proporcionar meios para o fazer científico, como o PIVIC, pelo qual registro este trabalho. Mas para além disso, por ter sido o cenário principal de minha vida nos últimos anos, proporcionando um crescimento pessoal inimaginado pelo calouro que ingressou nesta instituição em 2019.

Agradeço à minha família consanguínea que, mesmo receosos, confiaram e apoiaram essa jornada em busca de meus sonhos. Aos meus pais, avós, irmãos, sobrinhos, cunhados, tios. Todos. A saudade cultivada valeu a pena!

À minha *chosen family*, amigos para a vida, Breno e Caloene pelo apoio e momentos compartilhados nesse período. Amo vocês.

Ao meu querido amigo, Paulo, que mesmo de longe está presente em minha vida todos os dias de alguma forma. Te amo.

Aos tios do coração, Adelson e Rosa, que foram essenciais no início dessa caminhada.

Às amigas de graduação, que tornaram tudo mais leve: Ana Junia, Bruna, Emily (e Chico), Glória, Karina, Rossato, Sasa (as duas) e muitas outras que tive a sorte de conhecer.

Ao PET Biologia, sob a tutoria incrível da Profa. Dra. Ariádine. A todos os petianos e petianas que vieram e foram. Esse grupo foi peça fundamental para minha graduação, no qual vivenciei momentos e fiz amizades inesquecíveis.

Ao Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, pela acolhida imediata e por todos os ensinamentos. Esse foi o lugar que despertou meu eu-cientista para nunca mais adormecer.

Ao Laboratório de Imunopatologia, pela parceria nos trabalhos.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço, de modo especial, à minha orientadora Dra. Bellisa de Freitas Barbosa.
Pela oportunidade de orientação e por acreditar tanto no potencial de seus orientandos.

E ainda, à minha companheira neste trabalho, Marina Paschoalino,
com a qual aprendi muito com a coorientação e amizade.

Obrigado pelos ensinamentos de ambas.

SUMÁRIO

	Folha de Apresentação.....	8
	Resumo.....	9
1	Introdução	10
2	Resultados	12
3	Discussão	15
4	Métodos	18
5	Referências	23
6	Agradecimentos.....	28
7	Contribuição dos autores.....	28
8	Informações adicionais	28
9	Lista de Figuras	28
10	Lista de Tabelas	33
	Apêndices.....	34

Curcuminóides controlam a infecção por *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo)

Daniel Pereira Sousa¹, Marina Paschoalino¹, Samuel Cota Teixeira¹, Vilson Serafim Júnior², Eloisa Amália Vieira Ferro¹, Luís Octávio Regasini², Bellisa de Freitas Barbosa^{1,*}

¹Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

²Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, Brasil

*Autor correspondente:

Bellisa de Freitas Barbosa, *Ph.D*
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Umuarama, Av. Para, 1720 | 38405-320
Uberlândia-MG, Brasil
Telefone: +55 34 3225-8580
bellisafb@ufu.br

Resumo

O tratamento convencional para toxoplasmose congênita é a combinação de sulfadiazina com pirimetamina que, apesar de apresentar eficácia relativamente satisfatória, está associado a efeitos colaterais graves para a gestante e feto, exigindo estudos de novas estratégias terapêuticas. Nesse cenário, tratamentos baseados em compostos fitoterápicos são alternativas promissoras, devido aos poucos ou nenhum efeito adverso conhecido. Desta forma, o presente estudo investiga os efeitos de três compostos curcuminóides sintéticos na infecção *in vitro* por *Toxoplasma gondii*, no qual foram utilizados como modelos experimentais a linhagem trofoblástica humana BeWo, que é amplamente utilizada na literatura. Para isso, foi realizado ensaio de viabilidade celular por MTT, ensaios de invasão, proliferação intracelular e reversibilidade na infecção por *T. gondii* mediante tratamento com os curcuminóides por ensaio de β -galactosidase, e dosagem de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os resultados demonstraram que os curcuminóides só apresentaram ação citotóxica nas maiores concentrações e foram capazes de reduzir significativamente a invasão e proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo. Em adição, essa ação antiproliferativa é dependente da concentração e se mostra irreversível. Além disso, um dos compostos regulou positivamente a produção de ROS. Em conclusão, os efeitos antiparasitários desencadeados pelos curcuminóides podem estar relacionados à ação direta sobre os taquizoítos e à alteração do ambiente intracelular das células hospedeiras.

Palavras-chave: toxoplasmose congênita, plantas medicinais, cúrcuma, trofoblasto, terapia alternativa.

1 Introdução

Toxoplasma gondii (Filo Apicomplexa; Família Sarcocystidae) é um protozoário parasito intracelular obrigatório, capaz de invadir e se replicar em células nucleadas de todos os vertebrados endotérmicos, incluindo os seres humanos^[1-3]. Estima-se que mais de um terço da população global esteja infectada cronicamente com *T. gondii*^[4,5], com números que variam de 10 a 90% de pessoas infectadas a depender da região considerada^[6]. A maioria dos casos são assintomáticos, entretanto, indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e crianças com toxoplasmose congênita podem apresentar sintomas severos^[7,8].

Quando adquirida imediatamente antes ou durante uma gestação, a infecção por *T. gondii* pode resultar na toxoplasmose congênita, um grave problema de saúde pública caracterizado pela transmissão vertical de taquizoítos de *T. gondii* da mãe para o embrião ou feto^[4,7,9]. A taxa de transmissão vertical nos dois primeiros trimestres de gestação é relativamente baixa, mas se intensifica no terceiro trimestre, sendo equivalente a cerca de 90%^[10,11]. Em contrapartida, os danos fetais são maiores e mais graves quando a infecção ocorre no início da gestação se comparados com os de infecções mais tardias^[12,13]. A toxoplasmose congênita pode ocasionar reflexos perceptíveis durante a gestação ou nascimento como natimortos, abortos espontâneos, partos prematuros, danos fetais ou resultar em consequências à longo prazo como distúrbios neurológicos e/ou oculares nos bebês e/ou crianças^[12,14].

A placenta é um órgão transitório que se forma durante a gestação, e é o principal constituinte da interface materno-fetal. Composta por duas camadas celulares principais, sincitiotrofoblasto e citotrofoblasto, a placenta medeia a troca de nutrientes, gases e resíduos entre a mãe e o feto, além de produzir hormônios essenciais para a manutenção da gravidez^[15]. Os citotrofoblastos são uma camada importante da barreira placentária, e divide-se em duas subpopulações principais, o trofoblasto viloso e extraviloso. O trofoblasto extraviloso migra e invade a decídua materna, enquanto que o trofoblasto viloso entra para a conformação do vilo placentário^[16,17]. Assim, a placenta representa uma importante barreira física, que é capaz de proteger o embrião/feto de diversas infecções que podem ser transmitidas verticalmente^[18]. Entretanto, alguns patógenos, como o *T. gondii*, é capaz de atravessar essa barreira, principalmente nas gestações mais evoluídas, que perdem a continuidade das camadas de trofoblasto e, conseqüentemente, a espessura da barreira placentária^[19,20], e também por se beneficiarem da complexa interação dos mecanismos de tolerância para prevenir a reatividade aos aloantígenos^[18]. Há uma variedade de linhagens de

trofoblastos isolados de coriocarcinomas ou imortalizadas que são largamente empregadas em trabalhos na literatura. Dentre elas, destaca-se a linhagem BeWo, isoladas em 1968 essas células conservam muitas características de trofoblasto viloso humano, pois secretam hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), progesterona e estradiol^[21] e são amplamente utilizadas por nosso grupo de pesquisa^[22,23,24].

As drogas clássicas para prevenção ou tratamento da toxoplasmose congênita são indicadas seguindo um critério principal: a confirmação ou não da infecção fetal. Quando o parasito é detectado na gestante, mas não no feto, é administrada a espiramicina, um antibiótico macrólido a fim de tentar prevenir a transmissão vertical. A espiramicina, porém, não atravessa a barreira placentária, e, portanto, não é recomendada em casos de transmissão vertical confirmada^[4,25-27]. Já nos casos em que há infecção fetal confirmada, o tratamento de primeira escolha consiste na combinação de sulfadiazina com pirimetamina^[28,29]. Tais drogas combinadas são capazes de inibir enzimas importantes para a biossíntese de pirimidinas de *T. gondii*, que são cruciais para a sobrevivência e replicação do parasito^[30]. Entretanto, ambas as drogas estão associadas a efeitos tóxicos graves, como supressão gradual da medula óssea, distúrbios gastrointestinais e efeitos teratogênicos no feto durante o primeiro trimestre gestacional^[31,32]. Além disso, cerca de metade dos pacientes tratados com esses medicamentos persistiram com o DNA do parasito no sangue por um longo período de tempo ou permaneceram infectados^[33]. Nesse contexto, oportuniza-se a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que sejam mais eficazes e provoquem menos efeitos adversos.

Neste sentido, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram resultados promissores no possível reposicionamento de fármacos com potencial anti-*T. gondii*^[34-36], além de demonstrar o potencial de tratamentos naturais frente à infecção com compostos derivados de espécies vegetais do gênero *Copaifera*^[37,38]. Além disso, existem diversos outros trabalhos na literatura que apresentam tratamentos naturais como alternativas para combater a infecção por *T. gondii*^[39-42]. Dentre as tantas possibilidades de abordagens naturais de tratamento, destacam-se os compostos de natureza curcuminóide. Tais compostos são derivados da espécie *Curcuma longa* L. (Família Zingiberaceae), originária da Índia, mundialmente utilizada tanto para uso condimentar quanto na medicina complementar^[43,44]. O principal princípio ativo isolado dessa espécie é a curcumina, entretanto há outros componentes como desmetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina e ciclocurcumina^[45,46]. Os compostos derivados de curcumina, denominados curcuminóides, bem como a própria

curcumina, vêm sendo cada vez mais utilizados em pesquisas em razão de suas já comprovadas múltiplas atividades biológicas como anti-inflamatória^[47,48], antitumoral^[49,50], antioxidante^[48,51], antimicrobiana^[52,53], e antiparasitária^[54,55]. Neste contexto, Polaquini e colaboradores^[56] sintetizaram uma série de compostos análogos de curcuminóides e verificaram seu potencial antibacteriano por induzir destruição da membrana plasmática do patógeno, enquanto que Morão e colaboradores^[57] demonstraram o efeito de curcumina na interrupção do potencial de membrana de *Bacillus subtilis*. Portanto, o efeito antimicrobiano de curcuminóides pode representar uma nova forma de tratamento para diversas doenças infecciosas.

No cenário da toxoplasmose, diversos estudos já demonstraram a potencial ação anti-*Toxoplasma* de vários compostos curcuminóides^[58]. Resultados recentes mostraram que a curcumina foi efetiva em controlar a infecção aguda e crônica por *T. gondii* em modelo murino^[59], reduziu os danos patológicos induzidos pela infecção em camundongos^[60] e controlou o número de taquizoítos em células Vero^[61]. Em adição, curcumina também induziu perfil anti-inflamatório e moléculas relacionadas a neuroproteção em células precursoras neurais infectadas por *Toxoplasma*^[62]. Entretanto, não há estudos que abordem a ação desses compostos em um cenário de infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas, células importantes da interface materno-fetal. Desta forma, este trabalho tem como objetivo demonstrar pela primeira vez o efeito anti-*T. gondii* de três compostos sintéticos da classe dos curcuminóides em células trofoblásticas humanas.

2 Resultados

2.1 Curcuminóides alteraram a viabilidade celular apenas em concentrações elevadas

A avaliação da viabilidade das células BeWo frente ao tratamento com diferentes concentrações dos curcuminóides C13, C16 e C17 foi averiguada por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltertrazolina). Após 24 horas expostas ao tratamento, as células BeWo apresentaram perda de viabilidade nas concentrações mais altas dos compostos em relação às células não tratadas (meio – M). A dose mínima para o efeito tóxico foi de 8,0 µg/mL para o composto C13 (**** $P < 0,0001$) (**Figura 1A**), e 64,0 µg/mL para os compostos C16 (**** $P < 0,0001$) (**Figura 1B**) e C17 (** $P = 0,0072$) (**Figura 1C**). Além disso, o DMSO não induziu qualquer alteração na viabilidade celular (**Figura 1A-C**). Frente aos resultados, foi possível obter a concentração citotóxica de 50% (CC50) de cada composto, sendo 43,09 µg/mL ± 10,96 para C13; e ≥128 µg/mL para C16 e C17 (**Tabela 1**).

2.2 Curcuminóides reduziram significativamente a proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo

Para avaliar a proliferação intracelular de *T. gondii*, células BeWo infectadas com taquizoítos foram expostas às diferentes concentrações dos curcuminóides. Após 24 horas frente ao tratamento, foi observada uma redução significativa da proliferação intracelular dos taquizoítos em todos os compostos testados (C13, C16 e C17) em relação às células não infectadas e não tratadas (meio – M). A dose mínima para o efeito antiparasitário foi de 2,0 µg/mL para o composto C13 (**** $P < 0,0001$) (**Figura 1D**), 0,5 µg/mL para o composto C16 (** $P = 0,0086$) (**Figura 1E**), e 16,0 µg/mL para o composto C17 (**** $P < 0,0001$) (**Figura 1F**). Além disso, quando comparadas ao tratamento clássico (SDZ+PYR) as concentrações mais elevadas dos compostos C13 e C16 apresentaram um efeito antiproliferativo, em *T. gondii*, mais significativo (#### $P < 0,0001$) (**Figura 1D, E**). Como esperado, a combinação de SDZ+PYR foi eficaz no controle do parasitismo em células BeWo. Frente aos resultados, foi possível obter a concentração inibitória de 50% (IC50) de cada composto, sendo 7,81 µg/mL $\pm$ 1,39 para C13; 4,80 µg/mL $\pm$ 0,94 para C16; e 50,92 µg/mL $\pm$ 15,76 para C17 (**Tabela 1**).

2.3 Curcuminóides apresentaram uma ação antiparasitária irreversível de modo dependente da concentração

Para determinar se os efeitos antiparasitários promovidos pelos curcuminóides são irreversíveis, células BeWo infectadas com taquizoítos foram expostas aos compostos C13, C16 e C17 por 24 h, em seguida as monocamadas celulares foram lavadas e incubadas com meio sem nenhum tipo de tratamento por adicionais 24 h. Para comparação, foi quantificada a proliferação do parasito sob 24 h de tratamento. Foram utilizadas concentrações não tóxicas e com significante atividade anti-*T. gondii*, além do IC50 de alguns compostos. Em comparação com o grupo não tratado (100% de crescimento parasitário), todas as concentrações testadas de C13, C16, C17 e SDZ+PYR reduziram significativamente a taxa de proliferação do parasito, mesmo após 24 h da remoção do tratamento (**** $P < 0,0001$) (**Figura 2: painéis esquerdo e direito**). Após remoção do tratamento (painel direito), se comparadas ao tratamento com SDZ + PYR, não há diferença significativa da eficácia com as concentrações dos curcuminóides, exceto as concentrações 4,0 µg/mL de C13 (## $P = 0,0086$) e 32,0 µg/mL de C17 (## $P = 0,0037$). As concentrações maiores de C16 (&&& $P = 0,0002$) e C17 (&& $P = 0,0011$) demonstraram ser mais eficientes que as concentrações menores. Somente a concentração 4,8 µg/mL de C16 tendeu a ser reversível (++ $P = 0,0057$). Os resultados

sugerem que, tal qual a combinação de SDZ com PYR, os curcuminóides são capazes de manter seu efeito antiproliferativo em *T. gondii*, de maneira dependente da concentração, até mesmo após a remoção do tratamento (**Figura 2**).

2.4 O pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com os compostos curcuminóides C16 e C17 reduziu sua capacidade de invasão celular

Para avaliar uma possível ação direta dos curcuminóides na capacidade de invasão de *T. gondii*, os taquizoítos foram pré-incubados (1 h) com diferentes concentrações de C13, C16 e C17, e depois incubados (3 h) com células BeWo previamente aderidas. Em comparação com o grupo sem o pré-tratamento (meio – M), houve redução significativa (**** $P < 0,0001$) da capacidade de invasão celular dos taquizoítos pré-tratados com ambas as concentrações de C16 e C17. Por outro lado, o pré-tratamento com C13 e SDZ + PYR não alteraram a invasão de *T. gondii* em relação ao grupo controle (M). Quando comparados com o tratamento de SDZ + PYR, ambas as concentrações de C16 e C17 são substancialmente mais eficazes (#### $P < 0,0001$) (**Figura 3**).

2.5 Curcuminóides modularam a produção de ROS em células BeWo

Para investigar se os curcuminóides são capazes de modular o ambiente da célula hospedeira, foi realizada a dosagem de ROS frente ao tratamento com os compostos em condições infectadas ou não. Foi observado que, na ausência de infecção por *T. gondii*, ambas as concentrações de C17 causaram uma regulação positiva na produção de ROS em relação às células não infectadas e não tratadas (M - grupo controle negativo) ou células tratadas com SDZ + PYR (**** $P < 0,0001$; #### $P < 0,0001$). Além disso, a concentração de 50,0 µg/mL apresentou uma produção maior de ROS que a de 32,0 µg/mL (&&&& $P < 0,0001$). A concentração de 8,0 µg/mL do composto C16, bem como o tratamento clássico de SDZ+PYR, modularam levemente positivamente a expressão de ROS, quando comparada ao grupo controle, nas mesmas condições (** $P = 0,0014$) (**Figura 4**). Já frente à infecção por *T. gondii*, houve um aumento nos níveis de ROS em comparação às células não infectadas e não tratadas (++++ $P < 0,0001$). Mais uma vez, ambas as concentrações de C17 tiveram um aumento significativo na produção de ROS quando comparados ao controle Tg (M - **** $P < 0,0001$), à SDZ+PYR (#### $P < 0,0001$), à C17 não infectado (++++ $P < 0,0001$) e entre si (&&&& $P < 0,0001$) (**Figura 4**).

3 Discussão

A toxoplasmose atinge, cronicamente, mais de um terço da população global^[4,5]. Entretanto, a forma congênita da doença é a considerada de maior importância para a saúde pública, devido aos danos irreversíveis que pode causar a embriões, fetos e neonatos^[4,7,9]. Nesse contexto, o tratamento clássico utilizado é a combinação de sulfadiazina mais pirimetamina (SDZ + PYR)^[28,29], que apesar de apresentar uma eficácia relativamente satisfatória, está associado a efeitos colaterais graves tanto para a gestante quanto para o embrião ou feto^[31,32]. Desta forma, se oportuniza a necessidade pela busca por tratamentos com uma maior eficácia e que causem menos efeitos adversos.

Nesse sentido, abordagens com compostos de origem vegetal demonstram cada vez mais promissoras, principalmente em razão dos baixos, ou até mesmo ausentes, efeitos colaterais^[39,63]. Muitos compostos com tais características já foram testados no contexto da infecção por *T. gondii* com resultados positivos^[37-42]. Desta forma, o presente trabalho investigou os efeitos de três compostos sintéticos análogos aos curcuminóides (C13, C16 e C17) na infecção *in vitro* por *T. gondii* em modelos placentários, representada pelas células trofoblásticas humanas (linhagem celular BeWo). Embora muitos estudos já tenham demonstrado diversas atividades biológicas para os curcuminóides^[47-55], inclusive na infecção por *T. gondii*^[58-62], este é o primeiro que se propôs a apresentar resultados na interface materno-fetal, sendo importante para a compreensão de aspectos que envolvem o tratamento contra a toxoplasmose congênita.

Primeiramente, foi verificado se nove concentrações (128 µg/mL a 0,5 µg/mL) de cada composto curcuminóide poderiam afetar a viabilidade das células BeWo. Os resultados mostraram que a viabilidade celular foi alterada apenas nas condições de concentrações mais elevadas dos três compostos. Em seguida, as mesmas concentrações foram utilizadas no tratamento (24 h) de células BeWo infectadas com *T. gondii*, a fim de avaliar a proliferação intracelular do parasito. Foi observado que todos os compostos curcuminóides testados apresentaram ação antiparasitária tão eficazes quanto o tratamento padrão de SDZ + PYR. Nas concentrações mais elevadas, os compostos C13 e C16 demonstraram, inclusive, maior eficácia no controle do crescimento parasitário em relação à terapêutica clássica (SDZ+PYR). Curiosamente, o composto C16 foi capaz de reduzir significativamente a proliferação de *T. gondii*, em algum grau, em todas as concentrações testadas. Apenas as duas menores concentrações de C13 não foram capazes de reduzir a proliferação do parasito, ao passo que

apenas as quatro maiores concentrações de C17 apresentaram ação na proliferação de *T. gondii*.

Frente aos resultados da viabilidade celular, da proliferação intracelular de *T. gondii*, e dos cálculos de IC50, foi possível determinar concentrações alvo que, ao mesmo tempo, não prejudicaram a viabilidade de BeWo e promoveram redução significativa na proliferação intracelular de *T. gondii*. Assim, a próxima questão foi: os efeitos antiparasitários encontrados seriam irreversíveis na ausência do tratamento? Para isso, células BeWo infectadas com taquizoítos foram expostas aos compostos C13, C16 e C17 por 24 h, em seguida as monocamadas celulares foram lavadas e incubadas com meio sem nenhum tipo de tratamento por mais 24 h. Para comparação, foi quantificada a proliferação do parasito sob 24 h de tratamento. Os resultados mostraram que assim como o tratamento padrão de SDZ+PYR, todos os curcuminóides foram capazes de manter seu efeito antiproliferativo em *T. gondii*, de maneira dependente da concentração, mesmo após a remoção do tratamento.

Embora não haja um consenso sobre os mecanismos envolvidos na ação antiparasitária dos curcuminóides, outros estudos também demonstraram esse fenômeno em *T. gondii* e outros parasitos intracelulares. A curcumina foi capaz de induzir *in vitro* um perfil anti-inflamatório e moléculas relacionadas a neuroproteção em células precursoras neurais infectadas por *T. gondii*, o que sugere um potencial tratamento para perturbações neurológicas induzidas por essa infecção^[62]. Curcuminóides fluorados apresentaram ação anti-*T. gondii* e anti-*Leishmania major* na infecção *in vitro* de células Vero^[61]. No contexto *in vivo*, a nanoemulsão de curcumina resultou em compostos eficazes no controle da toxoplasmose aguda e crônica em modelo murino^[59], e nanocompósitos de curcumina@metal também foram eficientes na redução de danos patológicos induzidos pela infecção crônica em camundongos^[60]. Resultados semelhantes são observados em *Leishmania* spp.^[64,65] e *Trypanosoma* spp.^[66,67].

Partindo do resultado que os curcuminóides apresentam a capacidade de prejudicar a proliferação intracelular de *T. gondii*, tão eficiente ao ponto de se manter mesmo na ausência do tratamento, foi possível teorizar que tais efeitos poderiam estar interferindo diretamente em processos biológicos essenciais para a perpetuação do parasito. É amplamente reconhecido que o sucesso no estabelecimento da infecção por *T. gondii* depende da capacidade dos taquizoítos de se fixarem e invadirem as células hospedeiras^[68], o que é proporcionado por um complexo de organelas apicais que garantem ao parasito a capacidade de invadir quase qualquer célula nucleada de vertebrados endotérmicos^[69,70]. Nesse sentido, para testar se os curcuminóides são capazes de afetar a invasão de *T. gondii*, os taquizoítos

foram pré-incubados (1 h) com diferentes concentrações dos curcuminóides, e depois incubados (3 h) com células BeWo previamente aderidas. É sabido que o tratamento padrão de SDZ+PYR não apresenta qualquer ação na invasão por *T. gondii* nas fases iniciais da infecção^[37,38], e tal fato foi observado nesses resultados. Curiosamente, C13 também não apresentou nenhuma ação na invasão por *T. gondii*, possivelmente em razão da menor concentração, bem como de período de exposição insuficiente. Por outro lado, o pré-tratamento dos taquizoítos com C16 e C17 reduziu significativamente a capacidade do parasito em invadir as células BeWo.

Em conformidade com nossos resultados, outros estudos atribuem aos curcuminóides poderosos efeitos citotóxicos a patógenos. Compostos sintéticos análogos à curcumina apresentaram ação contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Tal ação parece estar associada a perturbações que levam à ruptura das membranas destas bactérias, bem como a fatores envolvidos na divisão celular^[56]. Resultados semelhantes foram observados na bactéria *Bacillus subtilis* tratada com curcumina simplificada, que parece ser capaz de alterar a permeabilização da membrana, com ruptura do potencial de membrana^[57]. Desta forma, pode-se teorizar que alterações semelhantes na membrana de *T. gondii* ou de suas organelas membranosas poderiam influenciar negativamente no sucesso da infecção. Além disso, o tratamento *in vitro* com curcumina foi capaz de promover a ruptura de microtúbulos e, conseqüentemente, a alteração na morfologia do apicoplasto de *Plasmodium falciparum*, reduzindo sua viabilidade^[71]. Dada a importância desta organela para os Apicomplexa, bem como a próxima relação filogenética entres estes protozoários, pode-se teorizar que os curcuminóides tenham também uma ação na ultraestrutura de *T. gondii*. Estudos futuros são necessários para verificar essa hipótese.

Além da ação direta dos curcuminóides na estrutura e função dos taquizoítos de *T. gondii*, não poderia ser descartada a hipótese de que os compostos são capazes de influenciar a modulação do ambiente intracelular dos trofoblastos. Para verificar essa possibilidade, foi realizada a dosagem das espécies reativas de oxigênio (ROS) frente ao tratamento com os curcuminóides em condições infectadas ou não. Interessantemente, apenas o composto C17 apresentou um aumento significativo de ROS, tanto nas condições infectadas quanto nas não infectadas.

As ROS são produzidas principalmente pelos fagócitos do hospedeiro e exercem ações antimicrobianas contra uma ampla gama de patógenos intracelulares^[72]. A curcumina atua tanto como pró-oxidante como antioxidante para modular a resposta imune inata através da

produção de ROS para a eliminação de parasitos^[73]. O tratamento com um análogo da curcumina em camundongos infectados com o também protozoário *Leishmania donovani* induziu a produção de ROS e, por conta disso, alterou a morfologia celular, causou a despolarização mitocondrial, o acúmulo de lipídios intracelulares e a parada do ciclo celular em promastigotas, consequentemente levando os parasitos a apoptose^[65]. Na infecção *in vitro* por *P. falciparum*, a curcumina é capaz de induzir a produção de ROS e, consequentemente, aumentar a expressão de CD36 por monócitos e macrófagos e a fagocitose do parasito, colocando-a como um potencial adjuvante no tratamento^[74]. Também no contexto da infecção *in vitro* por *P. falciparum*, a atividade pró-oxidante da curcumina desencadeia na produção de ROS e resulta em danos ao DNA mitocondrial e nuclear e desencadeando alterações de pH nas organelas, o que leva a morte do parasito^[75].

Em conclusão, os resultados do estudo sugerem que os compostos sintéticos análogos aos curcuminóides, C13, C16 e C17, apresentam potencial no controle da infecção por *T. gondii*, como foi demonstrado *in vitro* através da linhagem trofoblástica experimental BeWo. Os efeitos anti-*T. gondii* promovidos por esses curcuminóides podem estar relacionados à uma ação direta nas atividades biológicas do parasito, bem como a modulação do ambiente intracelular das células hospedeiras com a produção de ROS. Considerando os parâmetros evidenciados neste trabalho, os curcuminóides podem ser considerados potenciais alvos para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para toxoplasmose congênita, visto que, diferente do tratamento convencional, é capaz de diminuir significativamente a proliferação do parasito com uma baixa citotoxicidade. Entretanto, estudos mais detalhados são necessários para avaliar o efeito destes compostos *in vivo* e outros possíveis mecanismos *in vitro* e *ex vivo*.

4 Métodos

2.1 Síntese de curcuminóides

Compostos sintéticos derivados da curcumina (curcuminóides) foram gentilmente produzidos e cedidos pelo Prof. Dr. Luís Octávio Regasini (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, Brasil) a fim de avaliar seus efeitos contra *T. gondii* em modelos experimentais de interface materno-fetal humana. Tais compostos sintéticos já demonstraram efeitos antibacterianos em estudos prévios do Prof. Dr. Luís Octávio Regasini^[56,57], e suas estruturas químicas estão apresentadas na **Tabela 1**.

Para obter uma diluição estoque, os compostos liofilizados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados em soluções estoques a -80°C numa concentração final de $50.000\text{ }\mu\text{g/mL}$.

2.2 Cultura de células e parasitos

Células BeWo foram adquiridas comercialmente da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA), e mantidas em cultura em meio completo (RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 100 U/mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab)) sob condições ambientais adequadas (estufa umidificada a 37°C e 5% de CO_2). O Comunicado N°13/2012, pertencente ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU (CEP), declara que projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética por esse comitê.

Os taquizoítos de *T. gondii* utilizados foram da cepa RH altamente virulenta (clone 2F1), que expressam constitutivamente o gene da β -galactosidase, e foram cedidos pelo Dr. Vern Carruthers (Faculdade de Medicina da Universidade de Michigan, MI, EUA). Os parasitos foram mantidos por passagens seriadas em células BeWo cultivadas em meio completo com 2% de SFB sob as condições adequadas.

2.3 Ensaio de viabilidade celular

Foi avaliada a viabilidade das células BeWo na presença dos três compostos curcuminóides separadamente (C13, C16 e C17), a fim de estabelecer as concentrações não tóxicas de cada composto. Para isso, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltertrazolina)^[76]. Inicialmente, as células foram plaqueadas com 3×10^4 células/poço/ $100\text{ }\mu\text{L}$ em placas de 96 poços com meio completo a 10% de SFB sob as condições adequadas. Após 24 h, o sobrenadante foi removido e as células tratadas ($100\text{ }\mu\text{L/poço}$) com nove concentrações diferentes alcançadas por diluições seriadas ($128\text{ }\mu\text{g/mL}$ a $0,5\text{ }\mu\text{g/mL}$) de cada composto. Para avaliar a toxicidade do solvente, as células também foram tratadas com meio completo contendo DMSO a uma concentração de 0,25%, correspondente a porcentagem de DMSO utilizada na maior concentração de composto ($128\text{ }\mu\text{g/mL}$). Como controle negativo, foi utilizado apenas meio completo. As células foram incubadas com o tratamento por mais 24 h em uma atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, o tratamento foi retirado e substituído por uma solução contendo $10\text{ }\mu\text{L}$ de MTT (5 mg/mL) e $90\text{ }\mu\text{L}$ de meio completo durante 4 h. Por fim, os cristais de formazan resultantes

do metabolismo celular foram solubilizados pela adição de uma solução contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) e 50% de N,N-dimetilformamida (Sigma) por 30 min. As densidades ópticas foram medidas a 570 nm em um leitor de placas (*Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA*). Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis (% de viabilidade celular) em comparação com o controle positivo (100% de viabilidade celular). Dois experimentos independentes foram realizados em cinco replicatas.

2.4 Proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo tratadas com curcuminóides

Após avaliar a viabilidade celular, os compostos curcuminóides (C13, C16 e C17) foram usados para investigar seu possível efeito na proliferação intracelular de *T. gondii* em células BeWo. Inicialmente, as células BeWo foram plaqueadas com 3×10^4 células/poço/100 μ L em placas de 96 poços com meio completo contendo 10% de SFB sob as condições adequadas. Após 24 h, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1 (proporção de taquizoítos por célula) em meio suplementado a 2% de SFB. Após 3 h de incubação, os sobrenadantes foram retirados, as monocamadas de células foram delicadamente lavadas com tampão fosfato-salino (1 $\times$ PBS) para retirada dos parasitos extracelulares, e as células já infectadas foram tratadas (100 μ L/poço) com concentrações decrescentes (128 μ g/mL a 0,5 μ g/mL) de cada composto, diluídos serialmente em meio completo a 10% de SFB. Como controle positivo, as células infectadas foram tratadas com 200 μ g/mL de Sulfadiazina (SDZ) (Sigma) e 8 μ g/mL de Pirimetamina (PYR) (Sigma)^[37]. Como controle negativo, foram utilizadas as células infectadas sem nenhum tratamento. Após 24 h de tratamento, foi realizado o ensaio colorimétrico de β -galactosidase para quantificar a proliferação intracelular de *T. gondii*^[37]. A quantificação foi feita em porcentagem (% da proliferação de *T. gondii*) através da comparação com uma curva padrão contendo taquizoítos livres (variando de 1×10^6 a 15.625×10^3 taquizoítos). Os controles negativos representaram o crescimento incontido do parasito (100% de proliferação parasitária), portanto, foram utilizados para a medida da eficiência de cada condição de tratamento. As densidades ópticas foram medidas a 570 nm em um leitor de placas (*Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA*). Dois experimentos independentes foram realizados em oito replicatas.

2.5 Ensaio de reversibilidade

Diferentes concentrações dos compostos curcuminóides (C13, C16 e C17) foram selecionadas criteriosamente com base nos resultados dos ensaios de MTT e proliferação intracelular e através dos valores da concentração inibitória de 50% (IC50), que permite obter a concentração de cada composto necessária para inibir 50% da proliferação de *T. gondii*. As concentrações escolhidas foram utilizadas para avaliar a manutenção dos efeitos antiparasitários dos compostos na proliferação de *T. gondii*, através do ensaio de reversibilidade³⁸. Inicialmente, células BeWo foram plaqueadas com 3×10^4 células/poço/100 μL em duas placas de 96 poços com meio completo contendo 10% de SFB e incubadas nas condições adequadas. Após 24 h, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* a uma MOI de 3:1 em meio completo suplementado a 2% de SFB. Após 3 h de incubação, as placas tiveram seus sobrenadantes retirados, foram lavadas com $1 \times \text{PBS}$ para retirada dos parasitos extracelulares, e as células infectadas foram tratadas (100 μL /poço) com as concentrações escolhidas. Foram utilizadas as concentrações 4,0 $\mu\text{g/mL}$ de C13; 4,8 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de C16; e 32,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de C17. Como controle positivo, as células infectadas foram tratadas com 200 $\mu\text{g/mL}$ de SDZ e 8 $\mu\text{g/mL}$ de PYR^[37]. Como controle negativo foram utilizadas as células infectadas sem nenhum tratamento. Após 24 h, uma das placas foi submetida ao ensaio colorimétrico de β -galactosidase^[37], enquanto a outra teve o seu tratamento substituído por meio completo a 10% de SFB. Após 24 h de incubação na ausência do tratamento, a placa remanescente também foi submetida ao ensaio colorimétrico de β -galactosidase. Em ambas as situações a quantificação foi feita em porcentagem (% da proliferação de *T. gondii*) através da comparação com uma curva padrão contendo taquizoítos livres (variando de 1×10^6 a 15.625×10^3 taquizoítos). Os controles negativos representaram o crescimento incontido do parasito (100% de proliferação parasitária), portanto, foram utilizados para a medida da eficiência de cada condição de tratamento. Dois experimentos independentes foram realizados em oito replicatas.

2.6 Ensaio de invasão em taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados com curcuminóides

Para avaliar se os compostos curcuminóides (C13, C16 e C17) causam efeito direto nos taquizoítos de *T. gondii*, foi realizado o ensaio de invasão^[37]. Taquizoítos foram pré-tratados e incubados durante 1 h na presença das concentrações de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ de C13, 4,8 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de C16, e 32,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de C17. Além disso, os parasitos também foram pré-incubados com SDZ + PYR (200 + 8 $\mu\text{g/mL}$), e sem a presença de qualquer tratamento. Após 1 h de incubação, os parasitos pré-tratados foram utilizados para infectar células BeWo previamente aderidas em placas de 96 poços por 3 h. Logo em seguida, os parasitos

intracelulares foram quantificados utilizando o ensaio de β -galactosidase, conforme já descrito anteriormente. Dois experimentos independentes foram realizados em oito replicatas.

2.7 Dosagem intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A influência dos compostos curcuminóides (C13, C16, C17) na indução de ROS foi avaliada em células BeWo, baseando-se na oxidação intracelular dependente de peróxido de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) para formar o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Inicialmente, células BeWo foram plaqueadas com 3×10^4 células/poço/100 μ L em placas pretas de fundos transparentes de 96 poços com meio completo e 10% de SFB sob as condições adequadas. Duas condições experimentais foram utilizadas nesse ensaio, uma infectada tratada e uma não infectada tratada. Após 24 h, uma das placas foi infectada com taquizoítos de *T. gondii* a uma MOI de 3:1, por 3 h. As células foram então lavadas com 1 $\times$ PBS e ambas as placas foram tratadas com as concentrações 4,0 μ g/mL de C13; 4,8 e 8,0 μ g/mL de C16; e 32,0 e 50,0 μ g/mL de C17. Além disso, tanto para as células infectadas quanto para as não infectadas foram criados grupos controle tratados com SDZ + PYR (200 + 8 μ g/mL) ou somente meio completo. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como controle positivo para a produção de ROS. Após 24 h de tratamento, as células foram lavadas com 1 $\times$ PBS e incubadas com 150 μ L de H₂DCF-DA (10 μ M; diluído em 1 $\times$ PBS contendo 10% de SFB) por 45 min a 37°C e 5% de CO₂ no escuro. Por fim, a intensidade de fluorescência do DCF foi detectada utilizando um leitor de microplacas (*Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA*) em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 nm e 550 nm, respectivamente. Os dados são apresentados como intensidade mediana de fluorescência (MFI). Dois experimentos independentes foram realizados em oito replicatas.

2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism* versão 8.01 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, <https://www.graphpad.com>*). Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Foi realizado teste de comparações múltiplas de Bonferroni para constatação dos dados paramétricos. Em seguida, as diferenças significativas foram comparadas aos controles utilizando One-way ANOVA. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

5 Referências

- 1 Montoya, J. G. & Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *The Lancet* **363**, 1965-1976, doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X (2004).
- 2 Dubey, J. P., Hotea, I., Olariu, T. R., Jones, J. L. & DĂRĂBUȘ, G. Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. *Parasitology* **141**, 311-325, doi:10.1017/S0031182013001509 (2014).
- 3 Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C. T. & Gubbels, M. J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol* **69**, 463-485, doi:10.1146/annurev-micro-091014-104100 (2015).
- 4 Montoya, J. G. & Remington, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* **47**, 554-566, doi:10.1086/590149 (2008).
- 5 Paul, E. *et al.* *Toxoplasma gondii* seroprevalence among pregnant women attending antenatal clinic in Northern Tanzania. *Trop Med Health* **46**, 39, doi:10.1186/s41182-018-0122-9 (2018).
- 6 Mareze, M. *et al.* Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. *PLoS One* **14**, e0212375, doi:10.1371/journal.pone.0212375 (2019).
- 7 Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H. & Villena, I. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology* **148**, 1406-1416, doi:10.1017/s0031182021001013 (2021).
- 8 Halonen, S. K. & Weiss, L. M. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol* **114**, 125-145, doi:10.1016/b978-0-444-53490-3.00008-x (2013).
- 9 Vargas-Villavicencio, J. A., Besné-Mérida, A. & Correa, D. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. *Vet Parasitol* **223**, 195-204, doi:10.1016/j.vetpar.2016.04.024 (2016).
- 10 Robert-Gangneux, F. & Dardé, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* **25**, 264-296, doi:10.1128/cmr.05013-11 (2012).
- 11 Fallahi, S., Rostami, A., Nourollahpour Shiadeh, M., Behniafar, H. & Paktinat, S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* **47**, 133-140, doi:10.1016/j.jogoh.2017.12.003 (2018).
- 12 Carlier, Y., Truyens, C., Deloron, P. & Peyron, F. Congenital parasitic infections: A review. *Acta Tropica* **121**, 55-70, doi:10.1016/j.actatropica.2011.10.018 (2012).
- 13 Wyrosdick, H. M. & Schaefer, J. J. *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. *Animal Health Research Reviews* **16**, 150-162, doi:10.1017/S1466252315000183 (2015).
- 14 Oz, H. S. Toxoplasmosis complications and novel therapeutic synergism combination of diclazuril plus atovaquone. *Front Microbiol* **5**, 484, doi:10.3389/fmicb.2014.00484 (2014).
- 15 Turco, M. Y. & Moffett A. Development of the human placenta. *Development*. **146**, doi: 10.1242/dev.163428 (2019).
- 16 Aplin, J. D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* **99**, 681-92, doi: 10.1242/jcs.99.4.681 (1991).
- 17 Ander, S. E., Diamond, M. S. & Coyne, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci Immunol*. **6**114, doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114 (2019).
- 18 Erlebacher, A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol*. **31**, 387-411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003 (2013).

- 19 Błaszowska, J., & Górska, K. Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development. *Ann Parasitol.* **60**, 225-34 (2014).
- 20 Hoo, R., Nakimuli, A. & Vento-Tormo, R. Innate Immune Mechanisms to Protect Against Infection at the Human Decidual-Placental Interface. *Front Immunol.* **2070**, doi: 10.3389/fimmu.2020.02070 (2020).
- 21 Wolfe, M. W. in *Placenta and Trophoblast: Methods and Protocols Volume 1* (eds Michael J. Soares & Joan S. Hunt) 229-239 (Humana Press, 2006).
- 22 de Souza, G. *et al.* Cyclooxygenase (COX)-2 modulates *Toxoplasma gondii* infection, immune response and lipid droplets formation in human trophoblast cells and villous explants. *Sci Rep* **11**, 12709, doi:10.1038/s41598-021-92120-3 (2021).
- 23 Rosini, A. M. *et al.* LPS-mediated activation of TLR4 controls *Toxoplasma gondii* growth in human trophoblast cell (BeWo) and human villous explants in a dependent-manner of TRIF, MyD88, NF- κ B and cytokines. *Tissue and Cell* **78**, 101907, doi:10.1016/j.tice.2022.101907 (2022).
- 24 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* **35**, 152-162, doi:10.1016/j.placenta.2013.12.013 (2014).
- 25 Elsheikha, H. M. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. *Public Health* **122**, 335-353, doi:10.1016/j.puhe.2007.08.009 (2008).
- 26 Tamaru, S. *et al.* Fetal therapy of severe symptomatic toxoplasmosis using azithromycin. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **37**, 953-957, doi:10.1111/j.1447-0756.2010.01459.x (2011).
- 27 Peyron, F. *et al.* Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005222, doi:10.1371/journal.pntd.0005222 (2017).
- 28 I. Villena, D. *et al.* Pyrimethamine-sulfadoxine Treatment of Congenital Toxoplasmosis: Follow-up of 78 Cases Between 1980 and 1997. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **30**, 295-300, doi:10.1080/00365549850160963 (1998).
- 29 Doliwa, C. *et al.* Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression or polymorphisms in genes of therapeutic targets and ABC transporters. *Parasite* **20**, 19, doi:10.1051/parasite/2013020 (2013).
- 30 Anderson, A. C. Targeting DHFR in parasitic protozoa. *Drug Discov Today* **10**, 121-128, doi:10.1016/s1359-6446(04)03308-2 (2005).
- 31 Vijayalaxmi, K. K. & Vishalakshi, M. Evaluation of the genotoxic effects of pyrimethamine, an antimalarial drug, in the in vivo mouse. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **20**, 65-71, doi:10.1002/(SICI)1520-6866(2000)20:2<65::AID-TCM2>3.0.CO;2-K (2000).
- 32 Hernández-Díaz, S., Werler, M. M., Walker, A. M. & Mitchell, A. A. Neural Tube Defects in Relation to Use of Folic Acid Antagonists during Pregnancy. *American Journal of Epidemiology* **153**, 961-968, doi:10.1093/aje/153.10.961 (2001).
- 33 Habib, F. A. Post-treatment assessment of acute *Toxoplasma* infection during pregnancy. *J Obstet Gynaecol* **28**, 593-595, doi:10.1080/01443610802344332 (2008).
- 34 Barbosa, B. F. *et al.* Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. *Vet Parasitol* **187**, 44-52, doi:10.1016/j.vetpar.2011.12.039 (2012).
- 35 Castro-Filice, L. S. *et al.* Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. *Journal of Translational Medicine* **12**, 132, doi:10.1186/1479-5876-12-132 (2014).
- 36 da Silva, R. J. *et al.* Enrofloxacin and Toltrazuril Are Able to Reduce *Toxoplasma gondii* Growth in Human BeWo Trophoblastic Cells and Villous Explants from

- Human Third Trimester Pregnancy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, doi:10.3389/fcimb.2017.00340 (2017).
- 37 Teixeira, S. C. *et al.* Copaifera spp. oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. *Sci Rep* **10**, 15158, doi:10.1038/s41598-020-72230-0 (2020).
- 38 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* **13**, doi:10.3389/fcimb.2023.1113896 (2023).
- 39 Sharif, M. *et al.* The efficacy of herbal medicines against *Toxoplasma gondii* during the last 3 decades: a systematic review. *Can J Physiol Pharmacol* **94**, 1237-1248, doi:10.1139/cjpp-2016-0039 (2016).
- 40 Kavitha, N., Noordin, R., Chan, K. L. & Sasidharan, S. In vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity of root extract/fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. *BMC Complement Altern Med* **12**, 91, doi:10.1186/1472-6882-12-91 (2012).
- 41 Al Nasr, I., Ahmed, F., Pullishery, F., El-Ashram, S. & Ramaiah, V. V. Toxoplasmosis and anti-Toxoplasma effects of medicinal plant extracts-A mini-review. *Asian Pac J Trop Med* **9**, 730-734, doi:10.1016/j.apjtm.2016.06.012 (2016).
- 42 Leesombun, A., Boonmasawai, S., Shimoda, N. & Nishikawa, Y. Effects of Extracts from Thai Piperaceae Plants against Infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* **11**, e0156116, doi:10.1371/journal.pone.0156116 (2016).
- 43 Amalraj, A., Pius, A., Gopi, S. & Gopi, S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **7**, 205-233, doi:10.1016/j.jtcme.2016.05.005 (2017).
- 44 Sitabja, M. & Santosh, K. K. in *Herbs and Spices* (ed Ahmad Rabia Shabir) Ch. 6 (IntechOpen, 2021).
- 45 Anand, P. *et al.* Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol* **76**, 1590-1611, doi:10.1016/j.bcp.2008.08.008 (2008).
- 46 Aggarwal, B. B. & Harikumar, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 40-59, doi:10.1016/j.biocel.2008.06.010 (2009).
- 47 Peng, Y. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug Des Devel Ther* **15**, 4503-4525, doi:10.2147/dddt.S327378 (2021).
- 48 Menon, V. P. & Sudheer, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* **595**, 105-125, doi:10.1007/978-0-387-46401-5_3 (2007).
- 49 López-Lázaro, M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res* **52 Suppl 1**, S103-127, doi:10.1002/mnfr.200700238 (2008).
- 50 Imran, M. *et al.* Cucurmin, anticancer, & antitumor perspectives: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58**, 1271-1293, doi:10.1080/10408398.2016.1252711 (2018).
- 51 Llano, S., Gómez, S., Londoño, J. & Restrepo, A. Antioxidant activity of curcuminoids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **21**, 3752-3760, doi:10.1039/C8CP06708B (2019).
- 52 Zorofchian Moghadamtousi, S. *et al.* A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International* **2014**, 186864, doi:10.1155/2014/186864 (2014).

- 53 Trigo-Gutierrez, J. K., Vega-Chacón, Y., Soares, A. B. & Mima, E. G. d. O. Antimicrobial Activity of Curcumin in Nanoformulations: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 7130 (2021).
- 54 Rai, M. *et al.* Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **18**, 367-379, doi:10.1080/14787210.2020.1730815 (2020).
- 55 Mallo, N., Lamas, J., Sueiro, R. A. & Leiro, J. M. Molecular Targets Implicated in the Antiparasitic and Anti-Inflammatory Activity of the Phytochemical Curcumin in Trichomoniasis. *Molecules* **25**, doi:10.3390/molecules25225321 (2020).
- 56 Polaquini, C. R. *et al.* Antibacterial activity of 3,3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. *Bioorganic Chemistry* **90**, 103031, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103031 (2019).
- 57 Morão, L. G. *et al.* A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen* **8**, e00683, doi:doi.org/10.1002/mbo3.683 (2019).
- 58 Kalani, H. *et al.* Anti-*Toxoplasma gondii* Activity of Curcumin: A Systematic Review of Pre-clinical Studies. *Infect Disord Drug Targets* **23**, e200822207821, doi:10.2174/1871526522666220820185637 (2023).
- 59 Azami, S. J. *et al.* Curcumin nanoemulsion as a novel chemical for the treatment of acute and chronic toxoplasmosis in mice. *Int J Nanomedicine* **13**, 7363-7374, doi:10.2147/ijn.S181896 (2018).
- 60 El-Shafey, A. A. M. *et al.* Curcumin@metal organic frameworks nano-composite for treatment of chronic toxoplasmosis. *J Mater Sci Mater Med* **31**, 90, doi:10.1007/s10856-020-06429-y (2020).
- 61 Khan, T. A., Koko, W. S., Al Nasr, I. S., Schobert, R. & Biersack, B. Activity of Fluorinated Curcuminoids against *Leishmania major* and *Toxoplasma gondii* Parasites. *Chemistry & Biodiversity* **18**, e2100381, doi:10.1002/cbdv.202100381 (2021).
- 62 Bissacotti, B. F. *et al.* Curcumin modulates neurogliogenesis and purinergic receptor expression in neural precursor cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* **122**, 77-84, doi:10.1007/s00436-022-07698-y (2023).
- 63 Sepulveda-Arias, J. C., Veloza, L. A. & Mantilla-Muriel, L. E. Anti-*Toxoplasma* activity of natural products: a review. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **9**, 186-194, doi:10.2174/1574891x10666150410120321 (2014).
- 64 Elamin, M., Al-Olayan, E., Abdel-Gaber, R. & Yehia, R. S. Anti-proliferative and apoptosis induction activities of curcumin on *Leishmania major*. *Rev Argent Microbiol* **53**, 240-247, doi:10.1016/j.ram.2020.08.004 (2021).
- 65 Das, A., Kamran, M. & Ali, N. HO-3867 Induces ROS-Dependent Stress Response and Apoptotic Cell Death in *Leishmania donovani*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**, doi:10.3389/fcimb.2021.774899 (2021).
- 66 Molefe-Nyembe, N. I. *et al.* In Vivo Efficacy of Curcumin and Curcumin Nanoparticle in *Trypanosoma congolense*, Broden 1904 (Kinetoplastea: Trypanosomatidae)-Infected Mice. *Pathogens* **12** (2023).
- 67 Souza, J. M. *et al.* In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhancement of curcumin by its monoketone tetramethoxy analog diveratralacetone. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases* **1**, 100031, doi:10.1016/j.crpvbd.2021.100031 (2021).
- 68 Hall, C. I. *et al.* Chemical genetic screen identifies *Toxoplasma* DJ-1 as a regulator of parasite secretion, attachment, and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10568-10573, doi:10.1073/pnas.1105622108 (2011).

- 69 Adeyemi, O. S., Murata, Y., Sugi, T. & Kato, K. Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. *Int J Nanomedicine* **12**, 1647-1661, doi:10.2147/ijn.S122178 (2017).
- 70 Boothroyd, J. C. & Dubremetz, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol* **6**, 79-88, doi:10.1038/nrmicro1800 (2008).
- 71 Chakrabarti, R., Rawat, P. S., Cooke, B. M., Coppel, R. L. & Patankar, S. Cellular Effects of Curcumin on *Plasmodium falciparum* Include Disruption of Microtubules. *PLOS ONE* **8**, e57302, doi:10.1371/journal.pone.0057302 (2013).
- 72 Fang, F. C. 1.Antimicrobial Actions of Reactive Oxygen Species. *mBio* **2**, doi:10.1128/mbio.00141-11 (2011).
- 73 Khairani, S. *et al.* The Potential use of a Curcumin-Piperine Combination as an Antimalarial Agent: A Systematic Review. *Journal of Tropical Medicine* **2021**, 9135617, doi:10.1155/2021/9135617 (2021).
- 74 Mimche, P. N., Thompson, E., Taramelli, D. & Vivas, L. Curcumin enhances non-opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* through up-regulation of CD36 surface expression on monocytes/macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**, 1895-1904, doi:10.1093/jac/dks132 (2012).
- 75 Cui, L., Miao, J. & Cui, L. Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 488-494, doi:10.1128/aac.01238-06 (2007).
- 76 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4 (1983).

6 Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Gostaríamos de agradecer ao Prof. Dr. Luís Octávio Regasini pela disponibilização dos compostos utilizados no presente trabalho.

7 Contribuição dos autores

D. P. S. foi o responsável pela redação do trabalho, desenvolvimento do projeto, desenho experimental, execução dos experimentos e análise e interpretação estatística. M. P. foi responsável pela execução dos experimentos, análise e interpretação estatística e edição do manuscrito. V. S. J. e L. O. R. foram responsáveis pela síntese dos compostos curcuminóides. B. F. B. foi responsável por coordenar e projetar os experimentos, desenvolvimento do projeto, desenho experimental, análise e interpretação estatística e edição do manuscrito. E.A.V.F e S.C.T participaram da análise dos resultados e discussão dos mesmos. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

8 Informações adicionais

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

9 Lista de Figuras

Figura 1 - Viabilidade das células BeWo e proliferação intracelular de *T. gondii*. Células BeWo foram tratadas por 24 h em diluições seriadas (variando de 128 a 0,5 µg/mL) com os compostos sintéticos análogos aos curcuminóides C13 (A), C16 (B) e C17 (C). As células também foram tratadas apenas com meio de cultura (M - grupo controle negativo) e DMSO 0,25% (porcentagem utilizada na diluição da maior concentração dos compostos). A viabilidade celular foi analisada utilizando o ensaio colorimétrico MTT e expressa em porcentagens (% de viabilidade celular), sendo a absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura considerada 100% de viabilidade. Células BeWo infectadas com *T. gondii* foram tratadas por 24 h com as mesmas concentrações dos compostos C13 (D), C16 (E) e C17 (F). As células também foram tratadas apenas com meio de cultura (M - grupo controle negativo, considerado como 100% de proliferação parasitária) ou uma combinação de 200 µg/mL de sulfadiazina e 8 µg/mL de pirimetamina (SDZ + PYR, controle positivo de

inibição de crescimento parasitário). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada utilizando um ensaio colorimétrico de β -galactosidase e expressa em variação percentual em comparação ao controle. Os resultados de ambos os ensaios foram obtidos com base no teste One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para os dados paramétricos. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os gráficos representam os resultados de dois experimentos independentes realizados em cinco replicatas. * Comparação entre meio (M) e as condições submetidas aos tratamentos; # Comparação entre as condições tratadas com curcuminóides e as tratadas com SDZ + PYR.

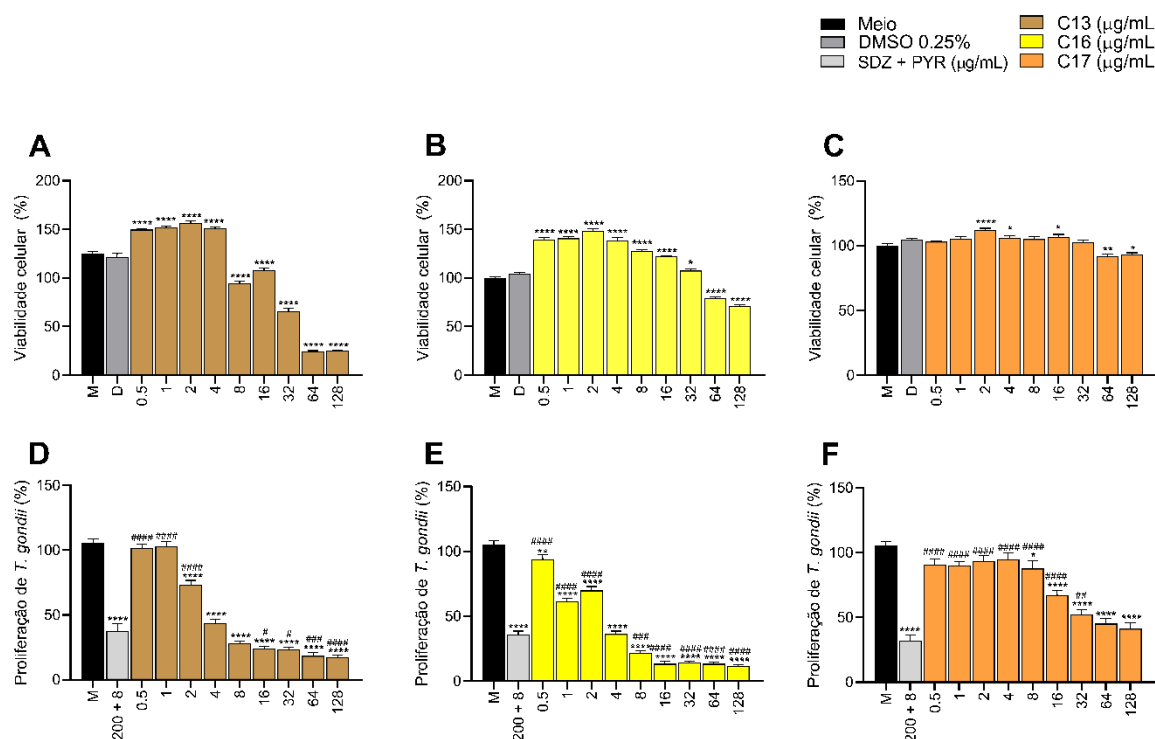


Figura 2 - Avaliação da manutenção dos efeitos anti-*T. gondii* por ensaio de reversibilidade. Células BeWo infectadas com *T. gondii* foram expostas a 4,0 $\mu\text{g/mL}$ de C13; 4,8 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de C16; 32,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de C17; 200 + 8 $\mu\text{g/mL}$ de SDZ + PYR ou apenas meio de cultura (M - grupo controle negativo) por 24 horas, seguido ou não da remoção do tratamento, substituição por meio de cultura novo e incubação por mais 24 horas. A proliferação do parasita às 24 horas de tratamento com os curcuminóides foi considerada para comparação. A taxa de reversibilidade mede a capacidade dos parasitas de se recuperarem do tratamento e retornarem à infectividade. A proporção é apresentada em variação percentual (% de reversibilidade do tratamento) em comparação com o grupo controle, que foi considerado como 100% de reversibilidade. O ensaio da β -galactosidase foi utilizado como indicador de atividade parasitária. Os dados são apresentados como médias $\pm$ desvio padrão

de experimentos realizados em oito repetições. Os resultados foram obtidos com base no teste One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para os dados paramétricos. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os gráficos representam os resultados de dois experimentos independentes realizados em oito replicatas. * Comparação entre as meio (M) e condições infectadas/tratadas com curcuminóides; # Comparação entre as condições infectadas/tratadas com curcuminóides e condições infectadas/tratadas com SDZ + PYR; & Comparação entre as diferentes concentrações dos compostos. + Comparação com o respectivo tratamento na condição de 24h de tratamento sem remoção posterior; & Comparação entre as duas concentrações de tratamento de cada composto.

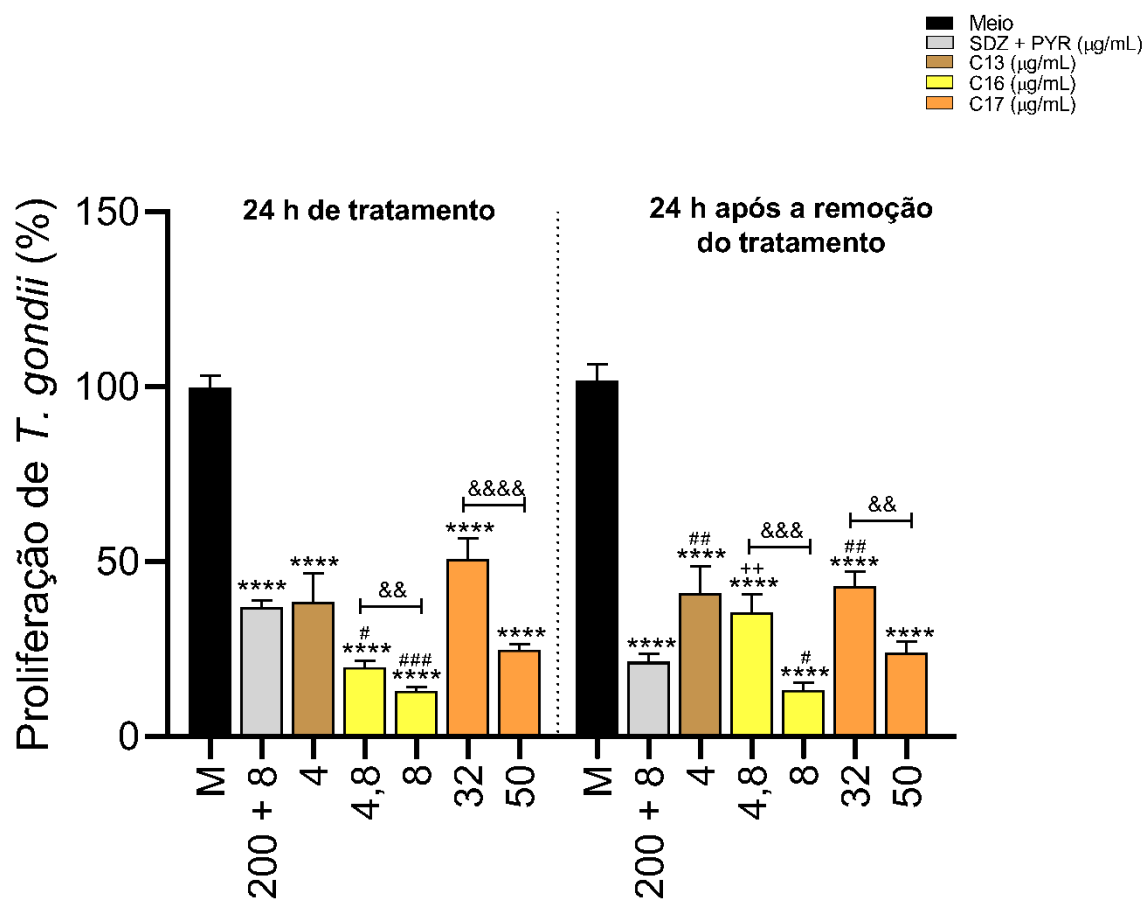


Figura 3 - Invasão de taquizoítos de *T. gondii* pré-tratados. Taquizoítos de *T. gondii* foram pré-incubados por 1 hora com 4,0 μg/mL de C13; 4,8 e 8,0 μg/mL de C16; 32,0 e 50,0 μg/mL de C17; 200 + 8 μg/mL de SDZ + PYR ou apenas meio de cultura (M – grupo controle negativo). As porcentagens da invasão de *T. gondii*, após 3 h de exposição às células BeWo, foi determinada usando o ensaio de β-galactosidase. Parasitas não tratados foram considerados como 100% de capacidade de invasão. Os dados são expressos como médias ±

desvio padrão de experimentos realizados em oito repetições. Os resultados foram analisados com base no teste One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para os dados paramétricos. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os gráficos representam os resultados de dois experimentos independentes realizados em oito replicatas. * Comparação entre parasitas não tratados e parasitas tratados; # Comparação de parasitas tratados curcuminóides e tratados com SDZ + PYR.

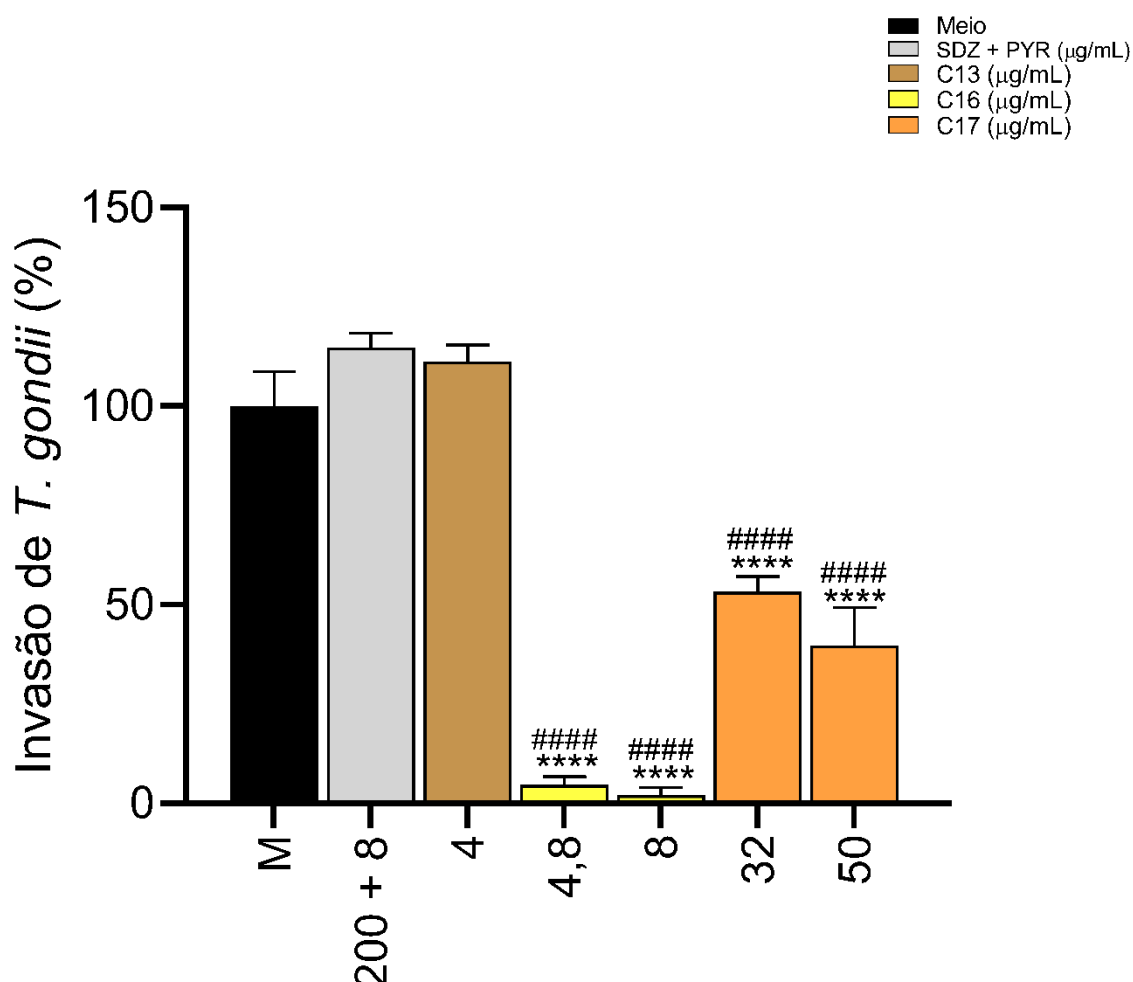
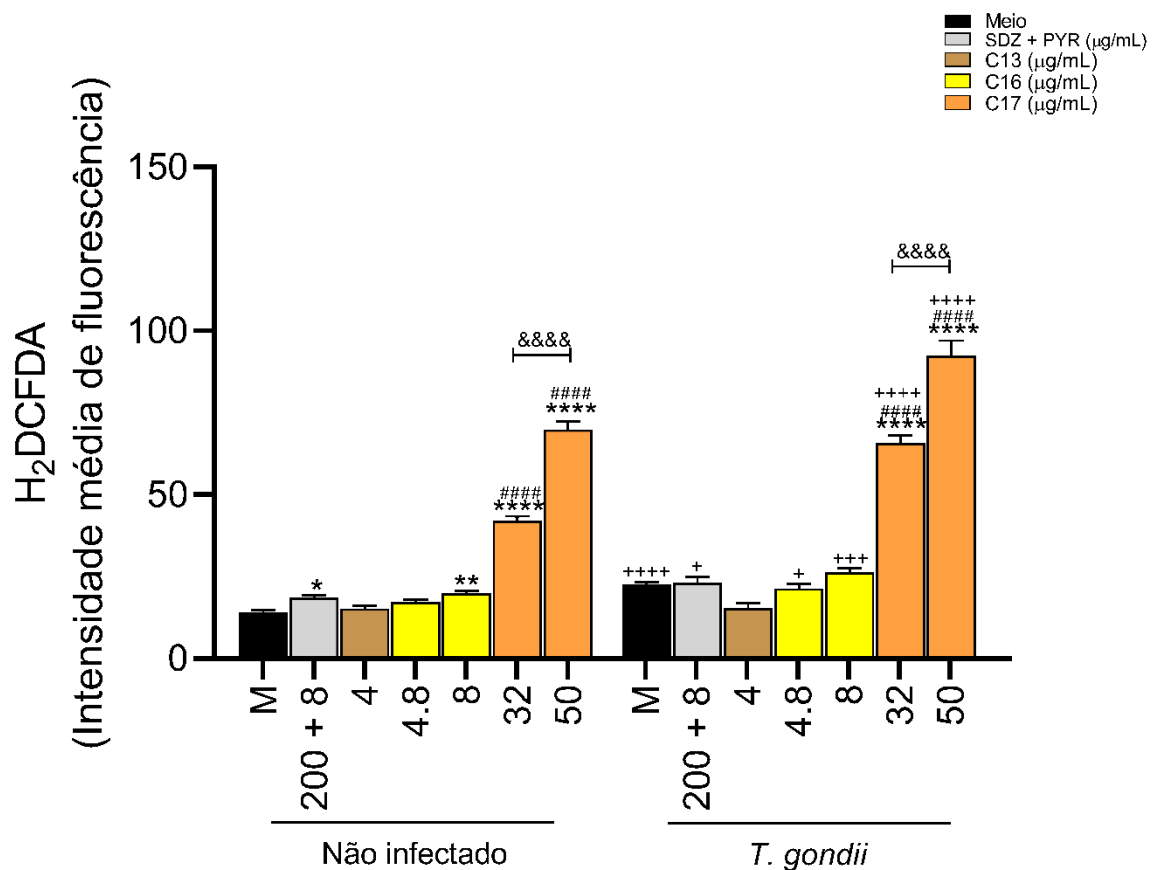


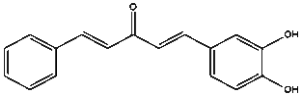
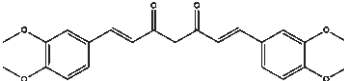
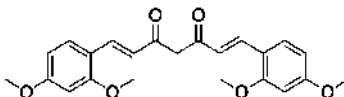
Figura 4 - Produção de ROS por células BeWo infectadas por *T. gondii* ou não, frente ao tratamento. Células BeWo foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii*, seguido de tratamento por 24 h com 4,0 $\mu\text{g/mL}$ de C13; 4,8 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de C16; 32,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de C17; 200 + 8 $\mu\text{g/mL}$ de SDZ + PYR ou apenas meio de cultura (M - grupo controle negativo). As células foram incubadas com a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA) e a produção de ROS foi mensurada por citometria de fluxo e expressa como intensidade mediana de fluorescência (MFI). Os dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em oito repetições. Os resultados foram obtidos com base no teste One-Way ANOVA e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para os dados

paramétricos. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os gráficos representam os resultados de dois experimentos independentes realizados em oito replicatas. * Comparação entre as condições não infectadas/não tratadas (M) e as condições não infectadas/tratadas; * Comparação entre as condições infectadas/não tratadas (M com *T. gondii*) e as condições infectadas/tratadas; + Comparação entre as condições não infectadas e as condições infectadas, independente de tratamento; # Comparação em relação ao tratamento SDZ + PYR; & Comparação entre as duas concentrações de tratamento de cada composto.



10 Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização dos compostos curcuminóides. Código e estrutura química dos compostos C13, C16 e C17. Concentração citotóxica de 50% (CC50) de cada composto com base nos resultados do ensaio de viabilidade celular. Concentração inibitória de 50% (IC50) de cada composto com base nos resultados do ensaio de proliferação intracelular.

Nomenclatura	Código	Estrutura	CC50	IC50
C13	POL - 3,4 OH		43,09 $\mu\text{g/mL} \pm 10,96$	7,81 $\mu\text{g/mL} \pm 1,39$
C16	PCR - 3,4 OCH ₃		$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	4,80 $\mu\text{g/mL} \pm 0,94$
C17	PCR - 2,4 OCH ₃		$\geq 128 \mu\text{g/mL}$	50,92 $\mu\text{g/mL} \pm 15,76$

Apêndices

APÊNDICE I – Trabalho de Conclusão de Curso nas normas de uma revista científica

O presente trabalho foi redigido sob as normas de uma revista científica, conforme assegurado pelo Art. 4º, parágrafos 1º e 2º, da Resolução CONIB Nº 12, de 27 de novembro de 2023, que dispõe sobre as Normas específicas para o Trabalho de Conclusão da Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura ou Bacharelado) da Universidade Federal de Uberlândia, nos quais versam que:

§ 1º. O TCCI terá como atividade obrigatória a elaboração de um Projeto de Pesquisa que será executado e concluído no componente curricular TCCII, no qual os resultados serão apresentados na forma de uma monografia ou artigo científico.

§ 2º. A monografia deverá ser redigida preferencialmente em português e de acordo com a Norma da ABNT vigente, enquanto que o artigo será organizado de acordo com a norma de uma revista científica indexada, a critério do Professor Orientador, podendo ser redigido em outro idioma (RESOLUÇÃO CONIB Nº 12, 2023, p. 3)

A referida resolução dispõe ainda no Art. 19º e parágrafo 1º:

Art. 19. O Trabalho de Conclusão de Curso II, quando redigido sob a forma de artigo científico seguirá as normas de uma revista indexada, escolhida, de comum acordo, entre Estudante e Professor Orientador.

§ 1º. As normas da revista selecionada deverão ser anexadas ao corpo do Trabalho de Conclusão de Curso (RESOLUÇÃO CONIB Nº 12, 2023, p. 6)

Desta forma, a redação do desenvolvimento deste trabalho foi feita respeitando as normas da revista *Scientific Reports*, cujo guia de submissão com as normas está disponível em: <<https://www.nature.com/srep/author-instructions/submission-guidelines>>.