



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Mateus Fracasso

**EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE CÉLULAS
PROGENITORAS NEURAIS ORIUNDAS DE EMBRIÕES DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Santa Maria, RS, Brasil

2018

Mateus Fracasso

**EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE CÉLULAS
PROGENITORAS NEURAIIS ORIUNDAS DE EMBRIÕES DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Co-orientadora: Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade

Co-orientadora: Dr^a Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS, Brasil

2018

Fracasso, Mateus
EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS
NEURAIIS ORIUNDAS DE EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS INFECTADOS
COM Trypanosoma cruzi / Mateus Fracasso.- 2018.
53 f.; 30 cm

Orientador: Aleksandro Da Silva
Coorientadores: Cinthia Melazzo de Andrade, Silvia
Gonzalez Monteiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2018

1. Doença de Chagas 2. Neurogenese 3. Resveratrol 4.
Neuroesferas 5. Células Gliais I. Da Silva, Aleksandro
II. Melazzo de Andrade, Cinthia III. Gonzalez Monteiro,
Silvia IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a).
Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:

Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE CÉLULAS
PROGENITORAS NEURAIIS ORIUNDAS DE EMBRIÕES DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi***

elaborada por

Mateus Fracasso

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva
(Presidente/Orientador - UFSM/UDESC)

Profa. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)

Profa. Dra. Virginia Cielo Rech (UFN)

Santa Maria, 20 de julho de 2018.

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida:

*Meus pais, Luiz Antônio e Arlete que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos.
Dedico a vocês esse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que está presente em todos os momentos de minha vida, me guiando, protegendo e ajudando a conquistar todos os meus objetivos.

A toda a minha família principalmente ao meu pai Luiz Antônio Fracasso, a minha mãe Arlete Bombonato Fracasso e toda minha família, que são o meu alicerce, e sem eles eu não seria nada, agradeço por me apoiarem nos momentos que pensei em desistir de tudo, pelos sábios conselhos, me dando força, também pelas vezes que pediram a proteção divina para mim. Não existem palavras para expressar meu eterno amor e agradecimento.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o Aleksandro Schafer da Silva, por toda paciência, confiança e dedicação durante a execução do trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos e por partilhar todo seu conhecimento comigo o qual me fez crescer muito tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal.

As minhas co-orientadoras Prof.^a Dr.^a Silvia Gonzalez Monteiro, por me acolher no laboratório, pela liberdade que me deste e por me deixar fazer parte da família Lapavet; a Prof.^a Dr.^a Cinthia Melazzo de Andrade pelo acolhimento e todo auxílio na execução do projeto no Lacvet.

Agradeço aos colegas e amigos, vocês fazem parte desse momento. Obrigada pelo carinho, pela força, pela ajuda incansável nos experimentos, pelo companheirismo e momentos inesquecíveis que passamos juntos. Agradeço em especial aos meus colaboradores, colegas e amigos, Nathiele Bottari, Thirssa Grando, Letícia Petry, Igor Magalhães, Carla Dall'acqua, Bruno Bortoluzzi, Dyenifer Almeida, Leonardo Bigolin, Matheus Baldissera, Bianca Zanardi e Cristieli Belle, vocês foram fundamentais nesse processo.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica (PPGBTX) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte institucional e financeiro concedidos.

*O ser humano é falho, hoje mesmo eu falhei
Ninguém nasce sabendo, então me deixe tentar*

(Projota – O homem que não tinha nada)

RESUMO
EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE CÉLULAS

PROGENITORAS NEURAIS ORIUNDAS DE EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi*

Autor: Mateus Fracasso

Orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do resveratrol na proliferação/auto-renovação, migração e neurogênese de células progenitoras neurais (CPNs) em embriões de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. Para o protocolo experimental *in vitro*, as fêmeas foram divididas em dois grupos: A (não infectada e gestante), B (infectada com *T. cruzi* e gestante). A infecção foi realizada 7 dias após o acasalamento, pela via subcutânea com cepas de *T. cruzi*. Esfregaço sanguíneo mostrou que as fêmeas infectadas apresentam formas trypomastigotas de *T. cruzi* no sangue 5 dias pós infecção, permanecendo a parasitemia até coleta das amostras. Completado treze dias de gestação foi realizada anestesia das fêmeas, e a remoção dos embriões. O telencefalo dos embriões foi coletado e cultivado em cultura celular. Nas culturas foi testado o efeito do resveratrol na concentração de 10µM sobre crescimentos das células nervosas. Para verificar o crescimento de NPCs, a divisão celular foi analisada pelo ensaio de iodeto de propídio. Os resultados revelaram que a infecção pelo *T. cruzi* diminui o tamanho das neuroesferas comparadas não infectadas. A análise feita por citometria de fluxo mostrou estimulação da neurogogênese em CPNs infectadas. O tratamento com resveratrol foi capaz de aumentar o tamanho das neuroesferas, embora não tenha conseguido evitar as alterações de tamanho das neuroesferas de embriões infectados. O resveratrol também não apresentou efeitos no ciclo celular, isto é, não verificamos diferença entre grupos para as fases do ciclo celular (S, G0/G1 e G2). Portanto, concluímos que a Doença de Chagas é capaz de afetar neurônios imaturos e maduros, assim como concluímos que o tratamento com RSV melhora a gliogênese e restaura a migração neural durante a infecção.

Palavras-chave: Doença de chagas, neurogênese resveratrol, neuroesferas, células gliais.

ABSTRACT

EFFECTS OF RESVERATROL ON CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS ORIGINATING FROM OF EMBRYOS OF MICE INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi*

Author: Mateus Fracasso

Advisor: Aleksandro Schafer da Silva

This study aimed to investigate the effect of resveratrol on the proliferation/self-renewal, migration, and neurogenesis of neural progenitor cells (NPCs) in embryos of mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi*. For the in vitro experimental protocol, females were divided into two groups: A (uninfected and pregnant), B (infected by *T. cruzi* and pregnant). The infection was performed 7 days after mating by the subcutaneous route with *T. cruzi* strains. Blood smear showed that infected females had trypomastigote forms of *T. cruzi* in the blood 5 days post infection, remaining parasitemia until samples were collected. Completed thirteen days of gestation was performed anesthesia of the females, and the removal of the embryos. The embryonic telencephalon was collected and cultured in cell culture. In the cultures, the effect of resveratrol at a concentration of 10 μ M on nerve cell growth was tested. To verify the growth of NPCs, cell division was analyzed by the propidium iodide assay. The results revealed that *T. cruzi* infection decreases the size of uninfected compared neurospheres. Analysis by flow cytometry showed stimulation of neurogenesis in infected NPCs. Treatment with resveratrol was able to increase the size of the neurospheres, although it failed to avoid the size changes of the neurospheres of infected embryos. Resveratrol also had no effects on the cell cycle, that is, we did not find any difference between groups for the phases of the cell cycle (S, G0/G1 and G2). Therefore, we conclude that Chagas disease is capable of affecting mature and immature neurons, as well as concluding that RSV treatment improves glycogenesis and restores neural migration during infection.

Keywords: Chagas Disease, neurogenesis, resveratrol, neurospheres, glial cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de ação do benznidazol e nifurtimox..... 18

Figura 2. Processo de neurogênese em cérebro adulto.....	20
Figura 3. Tipos celulares na Zona Sub Ventricular e seus respectivos marcadores.....	21
Figura 4. Estrutura química do <i>trans</i> -resveratrol.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros epidemiológicos em 21 países da América Latina.....	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DC – Doença de chagas

IgM – Imunoglobulina M
IgG – Imunoglobulina G
OMS – Organização mundial da saúde
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
CCR5 – C-C receptor 5 quimioquina
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
AChE- Acetilcolinesterase
ZSV – Zona subventricular
ZSG - Zona sub granular
SNC – Sistema nervoso central
SIRT1 – Sirtuinas tipo 1
NRF2 – Fator nuclear eritroide
SOD 2 – Superóxido dismutase
EROs – Espécies reativas de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14

2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	15
3.1.1 Características gerais do <i>T. cruzi</i>	16
3.1.2 Fases da doença de Chagas	16
3.1.3 Ciclo biológico.....	17
3.1.4 Medidas Preventivas.....	17
3.1.4 Epidemiologia da Doença	18
3.1.6 Tratamento	19
4. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E NEURONAIS CAUSADAS PELO <i>T. cruzi</i>	20
5. NEUROGENESE	21
6. RESVERATROL	24
Manuscrito	26
Conclusão	46
Referências	47
ANEXO A Certificado de Aprovação do CEUA/UFSM	53

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, os quais se encontram no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

As Referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido: Molecular and Cellular Biochemistry

1. INTRODUÇÃO

Os tripanosomas pertencem à família Trypanosomatidae e são parasitos intracelulares obrigatórios que apresentam uma ampla distribuição geográfica (Pérez 2012). Esses parasitos causam doenças no homem bem como em animais domésticos, sendo desta maneira de grande importância para saúde pública e veterinária. Os tripanosomas são divididos em duas seções, a stercoraria (Hoare, 1972) cuja a contaminação ocorre através das mucosas do hospedeiro ou pelas fezes do vetor como é o caso do *Trypanosoma cruzi*, já na seção salivaria a contaminação ocorre pela picada de vetores biológicos. A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi*, o qual afeta cerca de 18 milhões de pessoas em regiões endêmicas da América do Sul e Central (Rassi-Júnior et al., 2009, 2010, 2012). O principal vetor da DC é conhecido vulgarmente como barbeiro, pertencentes ao gênero *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Monteiro, 2017). A transmissão ocorre através da inserção de formas tripomastigotas presentes nas fezes do barbeiro na via cutânea, pelo ato de coçar, os quais alcançam a corrente sanguínea e disseminam-se para diferentes órgãos e tecidos como o trato gastrointestinal, coração e o cérebro (Monteiro, 2017). No entanto, casos de doença aguda tem sido associado a outra forma de infecção em humanos, isto é, pela via oral, através da ingestão *in natura* de suco de açaí e caldo de cana de açúcar (Inoue e Guedes 2005). De modo geral, a DC é assintomática, porém dentre os sintomas apresentados, as mais frequentes incluem dores abdominais, febre, palpitações, dor de cabeça, inchaço ao redor dos olhos (sinal de Romana).

As manifestações clínicas associados aos danos neurológicos podem variar de acordo com a fase da doença, bem como o grau de parasitemia. Dados da literatura revelam que na fase aguda pode ser notado meningoencefalites (Siqueira-Batista et al. 2007), também cefaleia, convulsões e sinais neurológicos (Ferreira et al. 2005). Na fase crônica os relatos da literatura evidenciam alterações da motricidade, da linguagem e da inteligência, distúrbios paralíticos do oculomotor, síndromes cerebelares, manifestações convulsivas, tais sinais caracterizam um comprometimento do sistema nervoso central (Jardim e Takayanagui 1993).

Além das formas de infecção supracitadas, a forma congênita é a forma de transmissão que não pode ser evitada, pelo fato de que essas mulheres podem não receber o tratamento devido aos seus efeitos colaterais (Bua et al. 2012). Alguns

fatores têm relação direta, como por exemplo, a carga parasitária (Hermann et al. 2004). As primeiras células a serem infectadas do embrião são os trofoblastos de acordo com Baergen (2006), pois esse tipo celular está ligado com a proliferação e morte celular, ou seja, dificultando o crescimento e desenvolvimento fetal (Ji 2013; Baergen 2006).

Diante da potencial gravidade das manifestações da DC em pessoas gestantes, se faz necessário à busca por novas drogas capazes de minimizar os efeitos colaterais e de combater o parasito. Nesse estudo utilizaremos o resveratrol, um composto natural, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já bem elucidadas (Bottari, 2016, Dasgupta e Bandyopadhyay, 2013). O resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) é um polifenol com alto potencial antioxidante, naturalmente encontrado em uvas, frutas e vinhos (Frémon, 2000), cujas propriedades visadas na medicina incluem a atividade antioxidante, anti-inflamatória, de imunomodulação e de quimioprevenção (De la Lastra e Villegas, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo é avaliar se a infecção por *T. cruzi* em camundongas gestantes interfere na neurogênese e gliogênese de seus embriões, assim como se o resveratrol poderia evitar ou minimizar essas alterações negativas no mesmo causado pela Doença de Chagas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se a infecção por *T. cruzi* em camundongas gestantes interfere na neurogênese e gliogênese de seus embriões.

Investigar se o resveratrol *in vitro* interfere na proliferação, migração, morte e destino neural de células precursoras neurais (CPNs) obtidas a partir de telencefalo de embriões oriundos de animais infectados com *T. cruzi*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS

Causada pelo *Trypanosoma cruzi*, a Doença de Chagas foi descoberta por Carlos Ribeiro Justiano Chagas em 1909 (Batista et al., 2007). A transmissão ocorre pelas fezes dos vetores das famílias de “Barbeiros” como são popularmente conhecidos *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Monteiro, 2017). Esses vetores, possuem ampla distribuição geográfica, entretanto por ser uma doença vetorial, percebe-se ao passar dos anos que tal moléstia vem sendo diagnosticada em países que não são endêmicos de acordo com estudo de Méndes et al. (2015), resultado da migração de pessoas infectadas (Moncayo e Silveira, 2009). Apesar de apresentar sintomas como inchaço ao redor dos olhos “Sinal de Romaña”, dores musculares e/ou febre em alguns casos, na grande maioria dos casos a DC é assintomática, dificultando o diagnóstico bem como o tratamento.

Além da transmissão vetorial do protozoário flagelado, ainda existem outras maneiras de contágio da doença, como a transmissão materno-fetal ou congênita (Reiche et al., 1996). Os dados literários apresentam alguns fatores que são determinantes neste tipo de transmissão, isto é, alta parasitemia ou então a reinfecção das mães gestantes (Andrade et al., 2006). Uma vez que a mãe gestante apresenta algum tipo de lesão na placenta, ela acaba sendo a porta de entrada para as formas tripomastigotas causarem danos no desenvolvimento da placenta, e posteriormente podendo atingir a circulação intrauterina e desta maneira alçar qualquer tipo de célula do feto (Andrade et al., 2006; Lana e Tafuri, 2000; Rey, 1991). Existem casos de infecção por *T. cruzi* pela ingestão de caldo de cana e suco de açaí in natura de acordo com Valente et al. (2006), sendo essa via a mais comum de acordo com os dados do Ministério da Saúde em 2015. Transplante de órgãos e transfusão de sangue, acidentes laboratoriais e alguns relatos de caso de transmissão via sexual também podem ser formas de infecção em humanos (Dias, 1997).

3.1.1 Características gerais do *T. cruzi*

O *T. cruzi* é considerado um parasito obrigatório, pertencente à família Trypanosomatidae, seção Stercoraria, da ordem Kinetoplastida segundo Hoare (1972) e gênero *Trypanosoma* (Taylor et al., 2017). Os membros desse gênero são heteroxenos (Taylor et al., 2017), ou seja, possuem dois ou mais hospedeiros (Monteiro, 2017) e em seu ciclo evolutivo, passam pelos estágios de amastigota onde possui corpo arredondado, no estágio de promastigota o cinetoplasto e o cinetossoma encontram-se anterior ao núcleo ausente de membrana ondulante. Já no estágio de epimastigota há presença de membrana ondulante e o citenoplasto e cinetossoma situam-se anterior ao núcleo e o estágio de tripomastigota o cinetoplasto e cinetossoma estão localizados na extremidade posterior dos protozoários e o flagelo forma uma membrana ondulante que é encontrada na parte lateral de todo o corpo (Monteiro, 2017; Taylor et al., 2017).

3.1.2 Fases da doença de Chagas

Uma vez infectado, o indivíduo entra na fase aguda da doença, sendo que esta fase ocorre entre 4 a 12 dias pós-infecção (Kashiwabara et al., 2013). Nessa fase o parasito encontra-se no sangue na forma tripomastigota e que não se multiplicam no sangue, sendo essa forma a infectante. Segundo Molina e Molina (2017) é possível o diagnóstico da zoonose, onde exames laboratoriais são utilizados para a confirmação da presença do parasito, dentre eles exame parasitológico direto, através da coleta do sangue periférico e/ou sorológico com anticorpos IgM anti-*T. cruzi* ou IgG anti-*T. cruzi* (Dias et al., 2015) e/ou usando hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência direta (IFI) segundo Neves et al (2005) ou teste imunoenzimático (Elisa) (Cavalcanti et al., 2008). Uma vez que o indivíduo passe para a fase crônica da doença, podem ser encontradas formas amastigotas desprovidas de flagelos que se multiplicam em inúmeros tipos celulares, principalmente no coração (Molina e Molina, 2017).

Desta maneira, a doença de Chagas quando avança à fase crônica pode evoluir para uma forma indeterminada que pode durar de 30 a 40 anos, para uma forma cardíaca, forma digestiva ou então uma forma mista de ambas (Kashiwabara

et al., 2013). Na cardiopatia chagásica crônica (Gomes et al., 2007), uma vez que os sistemas cardíaco e vascular são comprometidos, aumentam as chances do desenvolvimento de trombos, que por sua vez, podem levar a infartos cerebrais com sequelas ou até mesmo obtido do indivíduo (Aras et al., 2003), além de febre, hemorragia e hepatoesplenomegalia (Kashiwabara et al., 2013). Também, destaca-se o comprometimento do trato gastrointestinal, esse comprometimento deve-se a lesão causada pelo *T. cruzi* nos neurônios, que tem como consequência uma desordem nos movimentos peristálticos, levando a deficiências no esvaziamento do tubo digestivo bem como alterações anatômicas nos órgãos (Andreollo e Malafaia 2009; Pedra et al., 2011).

3.1.3 Ciclo biológico

Tendo em vista que existem várias formas de infecção supracitadas acima, a segunda forma mais comum é através de vetores ficando atrás da via oral de acordo com o Ministério da Saúde (2015). A transmissão por vetores infectados com formas epimastigotas de *T. cruzi* (Taylor et al., 2017). O ciclo biológico da doença transmitido de forma vetorial, acontece quando há uma ingestão das formas tripomastigotas pelo barbeiro ao picar um hospedeiro que esteja contaminado. Uma vez infectado, no intestino do barbeiro o *T. cruzi*, se transforma em formas epimastigotas que se direciona ao reto (Monteiro, 2017). No momento que as formas epimastigoras alcançam o reto, elas se transformam em tripomastigotas metacíclicas (forma infectante). A infecção acontece quando o barbeiro pica o indivíduo e acaba defecando próximo ao local da picada, ao coçar as formas infectantes entram em contato com o local da picada e desta maneira caem na circulação sanguínea, alcançando órgãos importantes como coração, baço e cólon (Monteiro, 2017).

3.1.4 Medidas Preventivas

No que se diz respeito a contaminação oral, torna-se um tópico mais difícil de ser controlado, uma vez que a contaminação é esporádica, medidas de seleção e higiene dos alimentos é a forma mais segura de evitar esse tipo de contaminação (Costa et al., 2013). Com relação a contaminação via transplante de órgãos e/ou

transfusão de sangue, exames laboratoriais são fundamentais para a detecção dos protozoários. No que se diz respeito a transmissão congênita, não possui nenhuma medida preventiva, porém a detecção da doença bem como o tratamento e acompanhamento da mesma é recomendado (Costa et al., 2013).

Tendo em vista que o “Mal de Chagas” além de ter outras formas de contágio também existe a vetorial, de ampla distribuição em todo território nacional, algumas medidas preventivas podem ser tomadas para que as chances de infecção sejam diminuídas, uma delas é a retirada dos barbeiros dos ambientes domiciliares para que as chances de interação entre homem-vetor sejam reduzidas segundo Bedin et al. (2001), e isso pode ser feito com dedetização periódicas.

3.1.4 Epidemiologia da Doença

A moléstia é considerada como uma doença negligenciada afetando cerca de 18 milhões de pessoas em regiões endêmicas da América do Sul e Central (Rassi-Júnior et al., 2009, 2010, 2012), sendo de maior prevalência na América Latina e endêmica de 21 países (Molina e Molina, 2017) e a OMS. Dados epidemiológicos de 2010 revelam que no Brasil, existem cerca de 1.156.821 de pessoas portadoras da doença. Na Tabela 1, nota-se uma mudança nos parâmetros epidemiológicos dos países da América Latina de 2000 a 2010.

Tabela 1. Parâmetros epidemiológicos em 21 países da América Latina.

Parâmetros	2000	2006	2010
Número de mortes/ano	21.000	12.500	12.000
Número de pessoas infectadas	18.000.000	15.000.000	5.742.167
Novas transmissões vetoriais/ano	200.000	41.200	29.925

Fonte: Adaptado de Pan American Health Organization, 200617 (TDR/WHO, PAHO, WHO); de World Health Organization, 2015.

Desordens ambientais, alterações climáticas bem como a migração de pessoas (Dias et al., 2015) tem levado a Doença de Chagas a países não endêmicos. Dados epidemiológicos revelam que em torno de 72 mil pessoas estejam infectadas no continente europeu (ECDC; 2014). Entre 2000 e 2013, no Brasil de acordo com o Ministério da Saúde (2015) foram registrados cerca de 1570 novos casos de Doença de Chagas na fase aguda, sendo que 91,1% dos casos

foram registrados na região Norte, assim como na região Nordeste (4,7%), Sul (0,2%), Centro-Oeste (1,8%) e o Sudeste (0,8%). O Estado do Pará foi responsável por 75% de todos os casos no país.

3.1.6 Tratamento

O tratamento da DC é feito através de antiparasitários como nifurtimox e benznidazol (Figura 1), sendo permitido no Brasil apenas o uso do benznidazol (Rochagan®) e a posologia varia com a forma de infecção (Pérez-Molina e Molina, 2017). Os fármacos têm efeito apenas na forma aguda da doença, agindo sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Costa et al, 2013). De acordo com Oliveira et al. (2008), se os fármacos foram administrados na fase aguda da doença, as possibilidades de cura alcançam 80%, já na fase crônica as chances de cura não ultrapassam 30%.

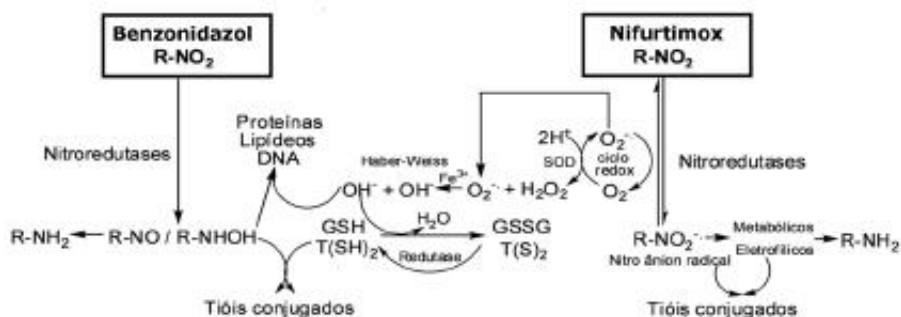


Figura 1. Mecanismo de ação do benznidazol e nifurtimox. Fonte: Adaptado

de Dias e Dessoy. 2009

O mecanismo de ação do benznidazol tem relação com intermediários metabólicos nucleofílicos. De acordo com Davanço (2015) o grupo nitro (NO₂) presente na molécula de benznidazol é reduzido ao grupo amino (NH₂) através de enzimas nitroreductases que atuam especificamente em R-NO₂. Posteriormente, uma reação catalisada pela NADPH P450 redutase forma um intermediário radical (R-NO₂·) e depois a formação de hidroxilamina (R-NHOH). O radical nitro formado neste processo estaria atuando no efeito tripanocida do fármaco através de ligações covalentes com macromoléculas do parasito, isto é, o DNA nuclear e mitocondrial,

lipídeos e proteína (Castro e Diaz de Toranzo, 1988; Urbina, 2002). Conforme descrito na bula do Rochagan® alguns efeitos coletareis são: urticária, fadiga, e insuficiência renal e hepática.

4. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E NEURONAIS CAUSADAS PELO *T. cruzi*

Tendo em vista que o parasito tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, nota-se na fase aguda o início do comprometimento neural (Batista et al., 2007), bem como alterações bioquímicas causadas pelo *T. cruzi*, como alterações na atividade da histona desacetilase (Campo, 2017) e da CCR 5 (Oliveira, 2016).

Estudos demonstram que o *T. cruzi* é capaz de ativar mediadores pró-inflamatórios como a Interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que ativam os macrófagos bem como a óxido nítrico sintase. O óxido nítrico atua diretamente sobre o *T. cruzi*, entretanto com a ativação do TNF- α induz células não-alvo a apoptose, que por consequência pode levar a morte súbita ou insuficiência cardíaca (Chuenkova e Pereira-Perrin, 2011). A AChE teve uma maior atividade na fase aguda quando comparada com a fase crônica da infecção causada por *Trypanosoma evansi* (Da Silva et al., 2011), sugerido assim, uma modulação na resposta inflamatória neste tipo de infecção. De acordo com a Hardison et al. (2006), a CCR 5 está intimamente ligada no controle da replicação do *T. cruzi*.

Uma vez que o ser humano é infectado, a DC chega ao seu estado crônico, já foram descritas na literatura onde ocorre um comprometimento neuronal de ordem motora e intelectual de acordo com estudos de Wacremann et al. (2008). Estudos revelam que o *T. cruzi* também exerce efeitos nas sinapses excitatórias (Chuenkova e Pereira-Perrin, 2011). O mecanismo neural exato provocado pelo parasito ainda não está claramente compreendido. Dentre os tipos celulares que são parasitados pelo *T. cruzi* são células gliais e as células de Schwann (Brenner e Andrade 1979), mas não é frequente a parasitemia em neurônios (Da Mata et al., 2000).

De acordo com um estudo de Batista et al. (2008), na fase aguda o *T. cruzi* pode levar a uma deservação autonômica ou então a penetração no sistema

nervoso central, levando a um quadro de meningoencefalite chagásica crônica. Um estudo de Pedreira et al. (1953) descreveu que o parasito é capaz de alcançar o sistema nervoso central, e na fase crônica pode ser encontrado no liquor, assim como a longo prazo pacientes com neuro-infecção causada pelo *T. cruzi* pode desenvolver casos de déficit cognitivo e/ou síndromes cerebelares, sintomas característicos da fase crônica (Batista et al. 2008). Também na fase crônica da doença o sistema nervoso central autônomo é afetado, o que tem início ainda na fase aguda e se agrava na fase crônica, onde nota-se a presença das formas amastigotas presentes nos gânglios parassimpáticos (Batista et al., 2008; Siqueira-Batista et al., 2007; Sica, 1994).

5. NEUROGÊNESE

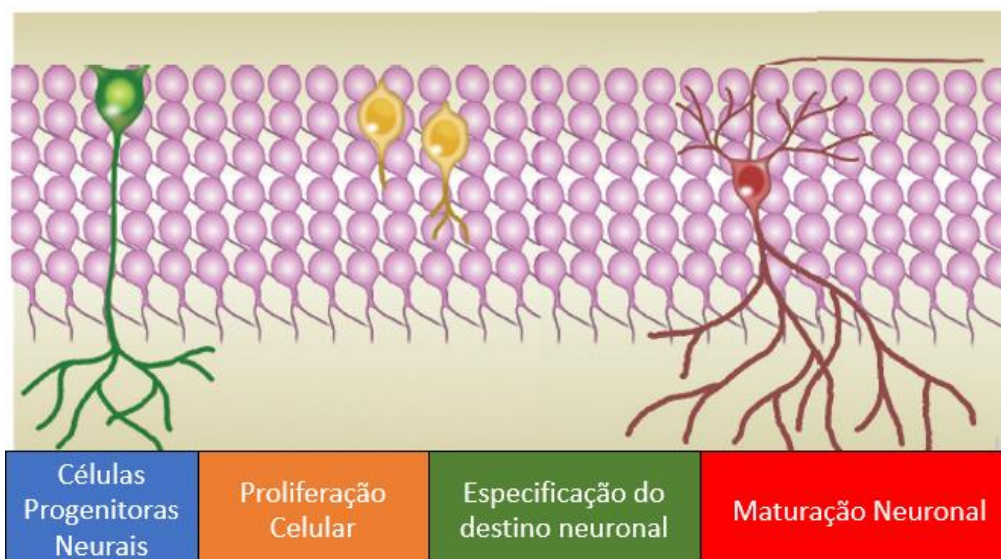
A neurogênese é primariamente um processo de desenvolvimento que envolve a proliferação, migração e diferenciação de célula tronco neural ou células progenitoras neurais (Figura 2) (CPNs), as quais podem dar origem a neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Altman e Das 1965). A neurogênese ocorre em regiões discretas do cérebro incluindo a zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais de acordo com Luskin (1993) e a zona subgranular (ZSG) do giro dentado (GD) em animais adultos (Kaplan e Hinds, 1977). Uma vez que as formas infectantes de *T. cruzi* alcancem o sistema nervoso central, pode haver um comprometimento nessas regiões supracitadas e conseqüentemente uma disfunção na proliferação/regeneração de novas células nervosas, causando os distúrbios nervosos já descritos.

Estudos recentes de Kempermann (2011) evidenciaram que na ZSG existem três tipos de células tronco, elas se diferem umas das outras pela sua forma de migração, forma morfológica, expressão de genes e/ou atividade de multiplicação. O tipo 1 de célula tronco, assemelha-se com células gliais morfológicamente e possuem singularidade de astrócitos (Filippov et al. 2003). Já o tipo 2 é descendente do tipo 1, sendo células de maiores proporções quando comparadas ao tipo 1 (Kempermann 2011), e divide-se em tipo 2a e 2b, diferindo uma da outra apenas na expressão de marcadores de diferenciação neuronal (Farzanehfar, 2018). Por fim,

as células do tipo 3 são consideradas neuroblastos migratórios e expressam marcadores de diferenciação neuronal (Farzanehfar, 2018).

Já na ZSV (Figura 3), estudos apontaram que existem quatro tipos celulares em adultos. As células do tipo B, assemelham-se com as células gliais e situam-se próximo as células endoteliais (Liu et al. 2006). As células tipo C são conhecidas como as células progenitoras da ZSV em encéfalos adultos (Kempermann 2011), já as células do tipo A nada mais são do que neuroblastos descendente das células do tipo C, elas ainda possuem a capacidade de proliferação, porém em uma menor escala do que suas progenitoras (Farzanehfar 2018).

Figura 2. Processo de neurogenese em cérebro adulto.



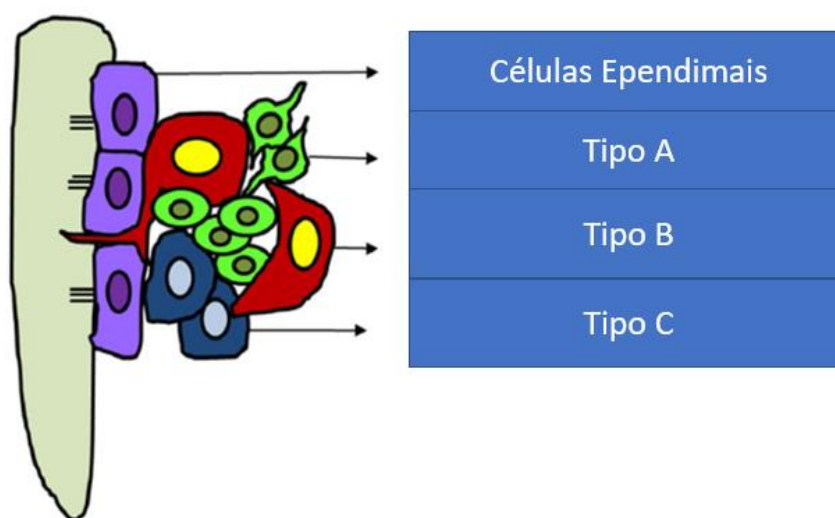
Fonte: Modificado (Dias, 2016)

A neurogenese é um processo importante, assim como altamente regulado, mas alguns fatores podem influenciar esse processo, como fatores ambientais, hormonas e/ou neuronais (Da Silva, 2009). Os moduladores neurogênicos adultos são amplamente estudados e conhecidos, destacam-se: transdução de sinalização, sistemas vascular e imunológico, fatores metabólicos e regulação epigenética (Horgusluoglu et al., 2016, Borsini et al., 2015, Urban and Guillemot, 2014). Um estudo conduzido por Heale et al. (1994) verificou aumento nos níveis de glicocorticoides e hormônios estressantes, que podem diminuir a taxa de proliferação das células neuronais no hipocampo. Essa diminuição, pode ser

explicada aumento e/ou acúmulo de glutamato nesta região (Gould et al., 2000; Moghddam et al., 1994).

Estudo revelou que gaiolas enriquecidas com brinquedos, túneis e/ou rodas favoreceram a neurogenese em roedores (Kempermann et al. 1997), deste modo, percebe-se que um aumento na atividade exploratória, estimulam a aprendizagem dos animais (Da Silva 2009). Esses novos neurônios que são oriundos da neurogenese atuam diretamente na memória (Kempermann 2002), ou seja, eles reforçam circuitos neuronais existentes de acordo com a necessidade do ambiente. Esses novos neurônios que se situam no GD têm sido comparados com neurônios já na sua forma madura, tendo funções sinápticas e potenciais de ação (Van Praag et al. 2002).

Figura 3. Tipos celulares na ZSV e seus respectivos marcadores.



Fonte: Modificado (Farzanehfar 2018)

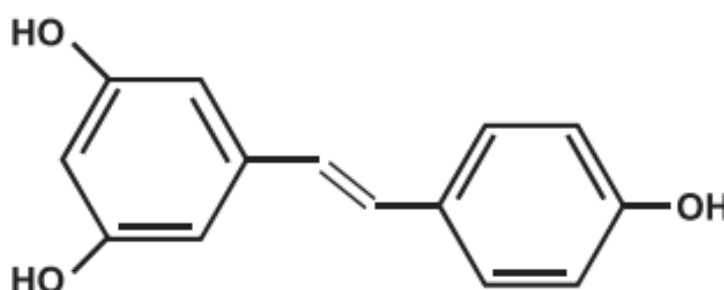
As doenças neurológicas bem como as lesões neuronais desencadeiam eventos que tem contribuição direta nos processos inflamatórios, morte neuronal, excitotoxicidade, disfunção da mitocôndria, também a não homeostase dos níveis de cálcio (McColl et al., 2008). Estudos realizados Horgusluoglu-Moloch et al. (2017) apontam que a parada da neurogênese em adultos está diretamente ligada ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. Além das doenças neurodegenerativas, na literatura as doenças de ordem

psiquiátricas vêm tendo um enfoque maior em sua relação com a neurogênese e já se sabe que os fármacos usados no tratamento da depressão são pró-neurogênicos (Malberg et al., 2000).

6. RESVERATROL

Além das propriedades antioxidantes, o resveratrol (Figura 4) é um importante neuroprotetor em condições de danos cerebral e nos processos neurodegenerativos (Anekonda, 2006). O resveratrol tem demonstrado um potente efeito no tratamento de outras parasitoses como é o caso da toxoplasmose (Bottari et al., 2016). O resveratrol, conforme descrito na literatura atua nos complexos da respiração celular da mitocôndria I e II, também tem ação na transdução de sinal envolvendo a proteína G além de interagir com receptores hormonais e com a vitamina D. Destaca-se também pela ativação da SIRT 1 e SIRT 3, podendo também modular diferentes genes que determinam a sobrevivência, crescimento e diferenciação de neurônios em diferentes locais do cérebro (Dasgupta e Bandyopadhyay, 2013). Tendo em vista que o *T. cruzi* tem a capacidade de ocasionar alterações neuroquímicas, o resveratrol exerce um papel significativo regulando funções importantes no SNC, neste projeto estudaremos os efeitos do resveratrol sobre a neurogênese em camundongos (embriões e adultos) infectados experimentalmente com *T. cruzi*.

Figura 4. Estrutura química do *trans*-resveratrol



Fonte: (Szkudelski, Szkudelska, 2018).

O resveratrol tem sido estudado como um cardioprotetor, pela sua ativação da SIRT 1, uma vez que já está elucidado que a ativação da mesma, contribui para a cardioproteção (Pereira et al., 2016; Kim e Dyck, 2015). Além da ativação da SIRT 1, o resveratrol modula a expressão do gene Nrf2 responsável pela defesa antioxidante (Pereira et al. 2016). Aumento da expressão da SOD2, remoção de EROs, assim como uma diminuição da expressão de NOX2 e NOX4 (Park e Pezzuto, 2015; Raj et al., 2014). O resveratrol possui uma gama de efeitos biológicos, isso deve-se pela ampla diversidade de alvos moleculares que este composto pode interagir, segundo Kuršvietienė et al. (2016), como por exemplo as SIRT supracitadas, além de fatores de transcrição, DNA polimerase, adenilato ciclase, citocinas (Mukherjee et al., 2010, Pirola e Frojdo, 2008), e redução da glicose sanguínea (Sadi et al., 2014).

Estudo de Kuršvietienė et al. (2016) reportaram que um aumento das EROs está intimamente ligado as doenças neurodegenerativas, dentre elas: doença de Alzheimer, doença de Parkinson e derrames. Conhecendo as propriedades do resveratrol, tem ocorrido estudos dessa molécula como um agente terapêutico para essas desordens neurodegenerativas. Estudos de Savaskan et al. (2003) por exemplo, demonstram que o uso de resvetatrol tem efeito neuroprotetor em casos de doença de Alzheimer, assim como aumenta os níveis de glutathiona e diminui os níveis do malondialdeído (Jang e Surh, 2003), alterações benéficas a saúde dos pacientes.

Manuscrito

Manuscrito 1:

Effects of resveratrol on neurological progenitor cells originating of mice embryos infected with *Trypanosoma cruzi*: neurogenesis and gliogenesis

Submetido à revista: Molecular and Cellular Biochemistry

**Effects of resveratrol on neurological progenitor cells originating of mice embryos
infected with *Trypanosoma cruzi*: neurogenesis and gliogenesis**

Mateus Fracasso^a, Nathieli Bianchin Bottari^a, Aniélen Dutra da Silva^a, Thirssa Helena
Grando^b, Micheli Mainardi Pillat^c, Henning Ulrich^c, Luiza Vivan^e, Cinthia Melazzo de
Andrade^{a,b}, Silvia Gonzalez Monteiro^b, Aleksandro Schafer da Silva^{d*}

^a Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and
Molecular Biology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Microbiology and
Immunology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^c Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo (USP), São
Paulo, SP, Brazil

^d Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC),
Chapecó, SC, Brazil.

^e Graduate Program Animal Health and Production Applied to Small Properties. Universidade
do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Xanxerê, SC, Brazil.

* Author correspondence: Department of Animal Science, University of Santa Catarina State.
680 D, Rua Beloni Trombeta Zanin, Chapecó/SC, Brazil Zip: 89815-630, Phone: 55 49 2049-
9560. (E-mail address: aleksandro_ss@yahoo.com).

Abstract

Chagas disease (CD), affecting about 7 million people is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, which. The central nervous system (CNS) is an important site for *T. cruzi* persistence in the host during the chronic phase of infection. Once the individual is infected, there is a motor and intellectual neuronal damage despite the doubts of the implications of CD for CNS development and repair. In the present study we tested resveratrol, a polyphenol found in grapes and widely studied for its neuroprotective and antioxidant properties, as novel therapy to improve neurogenesis and restore brain impairment affected in CD. In addition, we investigate the role caused by the parasite during a congenital infection and CNS development. For this study, NPCs obtained from telencephalon of infected and uninfected embryos were cultured in presence of resveratrol forming neurospheres. In order to verify the NPCs growth and cell division was analyzed by propidium iodide assay. The results revealed that *T. cruzi* infection decrease size of neurospheres compared uninfected and arrest G0/G1 phase. Analysis by flow cytometry showed stimulation of neurogliogenesis in infected NPCs. Therefore, we concluded that CD is capable of affected immature and mature neurons. The treatment with 10 μ M RSV improve gliogenesis and restore neural migration during chagas disease as a possible target to CD disease.

Key-words: Chagas Disease, NPCs, glial cells, mature neurons, biochemistry.

1. Introduction

Chagas Disease (CD) is caused by *Trypanosoma cruzi* a flagellated protozoan responsible to infect about 7 million of people in world according to (1). *T. cruzi* has a complex biological cycle, where vectorial transmission occurs by bugs of the *Rhodnius* and *Panstrongylus* genus (2). Beyond of vectorial transmission, other routes of infection are blood transfusion, sexual transmission, accidental infection (3), oral (4, 5) and congenital transmission (6, 7). The effects of CD on pregnancy, as well as on fetal outcome are still poor enlightened.

CD has a dual course of infection, the acute phase is characterized by the appearance of trypomastigote forms in blood between 4-12 days post-infection (8), showing clinical signs as fever and characteristic Romaña lesions and possible death dependent on the mass of parasite load. Surviving the acute phases, the patient evolves the chronic phase with heart and/or digestive tract impairment (8).

Congenital Chagas transmission is an important health hazard; however, there are no specific clinical marker of congenital Chagas' infection. Clinical features of congenital *T. cruzi* infection are heterogeneous, ranging from asymptomatic or oligosymptomatic infants to severe cases with meningoencephalitis, myocarditis or respiratory distress syndrome (9).

Once infection is established, *T. cruzi* may parasitize any tissue derived from embryonic mesoderm, endoderm and neuroectoderm. Although cardiac and intestinal pathologies are most frequent and therefore studied in detail, the central nervous system (CNS) is also seriously compromised in CD as meningoencephalitis appears as an important

cause of death in the acute phase of infection (10). Moreover, motor and intellectual neuronal impairment caused by *T. cruzi* were described (11, 12). The cell types more frequently infected by *T. cruzi* are astrocytes and Schwann cells (13), while less commonly neurons are infected (14). Without any doubts, neuroinfections caused by *T. cruzi* originate cases of cognitive deficits and cerebellar syndromes, usually observed in the chronic phase of the disease (14, 9). Despite there are some hints regarding CNS damage by CD, the process of neurodegeneration and possible neuroregeneration under parasite infection still remains unclear.

In view of the potential severity of CD manifestations in immunocompromised and pregnant women, as well as congenital defects and toxicity caused by available chemotherapeutic agents, it is necessary to search for new drugs capable of minimizing side effects and combating the parasite (15). In this study, resveratrol, a natural compound with well-elucidated antioxidant and anti-inflammatory properties (16, 17, 18, 19, 20, 21) will be administered for studying possible therapeutic effects. Such experimental strategy is also supported by previous knowledge of resveratrol acting as neuroprotector in conditions of brain damage and neurodegenerative processes (22) and activating SIRT 1 and SIRT 3 genes, which promote the survival, growth and differentiation of neurons in the brain (23). Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of resveratrol on neurogenesis induced by *T. cruzi*.

2. Material and methods

2.1. Animals and infection

For this study, ten Swiss female mice with a mean age of ± 60 days weighing 25 ± 5 g were kept in light/dark cycle (12hs) with controlled temperature and humidity (25°C, 70% respectively). The animals were divided into two groups and put to mate. For mating, each

female was left for 72 hours with a male. The efficiency of mating was confirmed by the presence of sperm after vaginal smear or appearance of the vaginal plug. All animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, protocol number 3060040517). Five animals were infected experimentally with *T. cruzi* acute strain Y 1×10^4 trypomastigotes/mL. Trypomastigote formed intraperitoneal route seven days after the mating of the animals (i.e. seventh day of gestation). The infection was monitored by counting the number of motile parasites in 5 μ L of fresh blood sample drawn from the lateral tail vein, as recommended by a standard protocol (43). The number of blood trypomastigotes was recorded every day post-infection, and the parasite load was expressed as parasites/mL of blood.

2.2. Isolation and culture of Neural Progenitor Cells (NPCs)

NPCs were isolated from the embryonic telencephalons day-13 (ED-13) of embryos mice according to (44). The animals were sacrificed in a CO₂ gas chamber and the telencephalons were dissected under aseptic conditions and incubated with 0.1 % trypsin for 5 min at 37°C. The cells were mechanically dissociated, and then, cells were plated at a density of 2×10^5 cells/mL in Dulbecco's Modified Eagle's medium/Ham's F-12 culture medium supplement 2% of B-27 (Life Technologies, Carlsbad, CA), 20 ng/mL of epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF-2) (both reagents from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and antibiotics (100 units/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin) and cultured at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% of CO₂.

2.3. Resveratrol

Resveratrol (98% purity; Sigma Aldrich) was diluted in DMSO 0.1% and added to undifferentiated NPC culture at 10 μ M concentration (33).

2.4. Analysis of cell proliferation by the cell cycle assay

After a 24-h post-treatment, cells were resuspended in PBS, fixed with 70% ethanol, labeled with propidium iodide (PI) (0.05 mg/ml), incubated at room temperature in the dark for 30 min, and filtered through 41- μ m spectra/mesh nylon filters (Spectrum, Rancho Dominguez, CA). DNA contents of cells was then determined on a flow cytometer (BD FACSCalibur; BD biosciences). Results were further analyzed using the FlowJo V10 software (Ashland, OR) and expressed as % of untreated control.

2.5. Flw Cytometry Analysis

For neural differentiation, neurospheres were plated into adherent poly-L-lysine- and laminin-precoated cell-culture grade dishes and cultured in the presence of 2% B-27 (Life Technologies). Samples were prepared for flow cytometry experiments as described previously (45, 46). Briefly, differentiated neurospheres were centrifuged for 5 min at 200 \times g and dissociated to a single cell suspension. Cells were fixed for 20 min in ice-cold 1% PFA in PBS, washed with PBS supplemented with 2% FBS, and incubated for 30 minutes with primary antibodies rabbit anti-GFAP (1:500; DAKO Systems, Carpinteria, CA), mouse anti- β 3-tubulin (1:500; Sigma- Aldrich), and rabbit anti-NeuN (1:500; Signaling). Following a washing step with PBS, cells were incubated with 1:500 Alexa 488- or 555-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) and then analyzed on a flow cytometer (BD FACSCalibur). Thirty-thousand events were acquired per sample. The data were analyzed using the FlowJo V10 software.

2.6. Statistical analysis

All statistical analysis was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test using Graph Pad Prism (Version 5.0) software. The results are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM) for the values obtained from at least three independent experiments. * $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

In order to confirm *T. cruzi* infection, the parasitemia was evaluated during 6 days (Fig. 1). The analysis of smear blood confirmed the presence of parasite 4day post infection. An increase of parasitemia was observed on day 5 PI confirming the infection and possible congenital transmission.

The effects of resveratrol on neurosphere proliferation were studied in the absence and presence of resveratrol in infected and control NPCs (Fig. 2A). Acute *T. cruzi* infection affected NPC growth by decreasing the diameter of NPCs when compared to uninfected control cells ($p < 0.05$). However, treatment with RSV increase significantly the size of neurospheres in effects *per se*, despite not having be able to restore the size of infected neurospheres, when compared with the uninfected group (Fig. 2B).

Undifferentiated neurospheres derivated from NPCs were subjected to cell cycle analysis (Fig. 2C). An increase of G0/G1 phase and decrease S and G2 phases in infected cells ($p < 0.05$) was observed in infected neurospheres, compared to the uninfected group. The treatment with 10 μ M RSV did not affect in G0/G1 and S phase distributions ($P > 0.05$), despite increasing the percentage of cells in G2 (phase preceding mitosis) (Fig. 2D) compared to the uninfected group.

3.1. Effects of RSV on differentiation of infected NPCs

The quantification of migration of infected and uninfected NPC are shown in Figure 3A. *T. cruzi* potentiated radial migration in infected NPCs ($p < 0.05$). Notably, 10 μ M RSV significantly restored cellular migration of infected NPCs, suggesting increased neural differentiation (Fig. 3B).

3.2. *T. cruzi* stimulates neurogenesis and gliogenesis

Induction of NPC differentiation was achieved by growth factor removal. The progress of gliogenesis and neurogenesis was estimated by quantification of cell populations positive for glial (GFAP) or neural cell (β 3-tubulin and NeuN) marker expression. *T. cruzi* infection led to an increase in GFAP⁺ cells ($p < 0.05$), stimulating gliogenesis, under this condition, 10 μ M RSV was not able to reduce the rate of glial differentiation (Fig. 4A).

The progress of neuronal differentiation was analyzed by the frequency of immature (β 3-tubulin⁺ cells) and mature (NeuN⁺ cells) neurons. For both cases, *T. cruzi* ($p < 0.05$) improved neurogenesis when compared to uninfected controls. On the other hand, 10 μ M RSV decreased the frequency of imature cells (Fig. 4B) and increased the number mature neurons (Fig. 4C).

4. Discussion

We investigated the neurogenesis in NPCs infected by *T. cruzi* through congenital transmission, being a pioneering study for further understanding of Chagas disease. Our first experimental strategy was to mimic an acute infection of the female aiming at *T. cruzi* vertical transmission. According to the (24) the trypomastigote forms exceeds the transplacental barrier causing damage in the development of the placenta and later affects intrauterine circulation. By this way it may infect almost any cell type of the fetus (25, 26). The parasitemia increased

until 7 days post infection, which corresponded to the 13 day gestation of females mice. This phase is characterized by the acute phase with a large number of trypomastigote forms in blood circulation. Some studies using Y strain of *T. cruzi* also showed the peak of parasitemia after 4 days following infection (27, 28) corroborating our data. Therefore, knowing that the number of circulating parasites was high, and embryos indirectly and/or directly affected with subsequent effects on neurogenesis.

The majority of infected mice showed CNS parasitism detectable only by immunohistochemical staining (29), corroborating previous data suggesting that despite being an immune specialized site, the CNS is able to control, but not eliminate, tissue parasitism. Once invaded embryo CNS, *T. cruzi* infection resulted in reduced neurospheres diameter. A possible explanation may be parasite-derived neurotrophic factor (PDNF) (30) activating Trk (tropomyosin-related kinase) with survival and neural multiplication (32, 31).

In an attempt to find a natural compound capable of protecting against damage caused by the parasite, the resveratrol, a natural compound grape (32), was investigated. Previous findings have suggested that resveratrol has anti-inflammatory properties (31), related to an ability to modulate intracellular signaling pathways including those involving cellular stress. Thus, to elucidate the mechanisms of resveratrol on neuropathogenesis of CD in brain, we investigate cellular mechanisms mediated by resveratrol in infected NPCs. The results showed that 10 μ M RSV affects neurosphere proliferation by increasing the diameter in *per se* effect. Our results are in accordance with (33), who demonstrated that the dose of 10 μ M was more effective. However, the RSV was not possible to restore the diameter of neurospheres during *T. cruzi* infection. In order to confirm that resveratrol can directly inhibit cell cycle machinery, all cycle phases measurements were analyzed by propidium iodide assay. The data suggest that *T. cruzi* infection arrests the G0/G1 phase and decreases S and G2 phase. However, the RSV did not affect cell cycle distribution in CD during brain development.

These findings show that 10 μ M RSV does not influence cell division and repair in the telencephalon, protecting neurogenesis in the infected group.

To gain insight the biological effects of RSV on neurogenesis, we examined its influence on neuronal migration of infected NPCs. Our data reveal that *T. cruzi* enhances neural migration of differentiated NPCs, but on the other hand the RSV decreases neural migration. This compound reverted Chagas-induced neural network formation. It was previously reported by (34), that patients with chronic CD are less sensitive to the age-related nervous degeneration. The studies showed that the *T. cruzi* can be neutral or also contribute to neuronal regeneration (35, 36, 37,38, 39).

T. cruzi infection results in the release of PDNF (30) activating Trk receptors and inducing neurite outgrowth and resistance of neurons and glial cells against apoptosis, and thus may affect parasympatic system regeneration during *T. cruzi* infection, perhaps influencing radial migrations in infected NPCs. The treatment with 10 μ M RSV also significantly reduced the percentage of radial migration of infected NPCs.

Neurogenesis is a developmental process and involves the proliferation, migration, and differentiation of NPCs, which may give rise to neurons, astrocytes and oligodendrocytes (40). In order to investigate the destination of differentiated NPC, quantitative analysis of anti-GFAP, β 3-tubulin and NeuN marker expression was undertaken by flow cytometry. *T. cruzi* markantly increased the number of GFAP⁺ cells stimulating gliogenesis in infected NPCs. According to (41), CNS parasitism was mainly detected as amastigote forms of the parasite, 80% of the *T. cruzi*⁺ area coincided with GFAP⁺ cells spread throughout brain parenchyma in both, acute and chronic phases. The response glial cells is crucial for immunity against intracellular pathogens such as the protozoan parasite *T. cruzi*.

In situation of brain injury and parasite infection, inflammatory stimuli such as cytokines involved. The increase in cells GFAP⁺ also relates to the capability of the parasite to

release PDNF (30), guaranting the immune response of CNS (39, 36). Moreover, RSV contributed to stimulating gliogenesis in acute *T. cruzi* infection in brain development. This effect of RSV enhances gliogenesis in infected NPCs, suggestion possible mechanisms for repair processes activated in response to neuronal injury, such as as CD infection, in order to eliminate the parasite. As reported by (42), RSV directly activates the Sirt1 gene, suppressing proliferation of NPCs and directing their differentiation towards the astroglial lineage at the expense of the neuronal lineage.

In addition, we also carried out anti- β 3-tubulin and anti-NeuN immunostaining evaluated in neurospheres and analyzed the cultures by flow cytometry. *T. cruzi* infection increased neurogenesis in SVZ of embryos throught of high β 3-tubulin⁺ cells (immature neurons) and NeuN⁺ cells (mature neurons) in current study. These results reveal that imature and mature neurons are over express by *T. cruzi* probably due to the interaction of PDNF with Trk receptors (35) As expected, 10 μ M RSV improved neurogenesis of infected NPCs stimulating both imature and mature neurons. The capacity of RSV to neuroprotection is related to the activation of also SIRT1 and SIRT3 genes, responsable for survival, growth and differentiation of neurons in different places of the brain (23).

In summary, *T. cruzi* infection induces changes in the neurosphere size and cellular differentiation. *T. cruzi* induce neurogliogenesis in NPCs from infected embryos during *T. cruzi* congenital transmission. In addition, our study defines mechanism of RSV on brain development and propused neurogenic properties of RSV on infected NPC, possibly providing novel therapeutic approaches.

Ethics Committee: These experiments was approved by the Ethics Committee on Animal of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), under protocol number 3060040517.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial support: This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Excelência Acadêmica (Proex Process number: 23038.005848/2018-31. Aid Nº: 0737/2018) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Edital Universal 2016). HU acknowledges funding by the São Paulo Research Foundation FAPESP (Proj. No. 2012/50880-4) and CNPq.

References

1. World Health Organization. 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. Monteiro SG. 2017. Parasitologia na medicina veterinária. Roca. Rio de Janeiro.
3. Dias JCP, Coura JR. 1997. Epidemiologia. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro.
4. Inoue K, Gudes G. 2005. SC estima em 50 mil contaminados por caldo de cana. Folha Online.
5. Pinto, AYdN, Harada GS, Valente VC, Abud JEA, Gomes FdS, de Souza GCR, Valente, SAdS. 2001. Acometimento cardíaco em pacientes com Doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. Rev Soc Bras Med Trop 34:413-419. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000500003>.
6. Carlie Y, Sosa-Estani S, Luquetti A O, Buekens P. 2015. Congenital Chagas disease: an update. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 110(3):363-368. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140405>.
7. Yves C, Truyens C. 2010. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research: Maternal–Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*. *American Trypanosomiasis* 2:539–581. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8>.
8. Kashiwabara YB, Paiva RMRA, Da Silva VYNE, Kashiwabara, TGB. 2013. Doença de chagas - revisão de literatura. Braz J Surg Clin Res 4: 49-52.
9. Batista RS, Gomes AP, Toledo-Monteverde D, Moraes-Martins G, Majeski-Colombo M, Messeder JC, Antonio VE. 2008. Neuroinfecção humana por *Trypanosoma cruzi*. Rev Neurocienc 16:310-315.

10. Antunes ACM, Cecchini FML, Bolli FVB, Oliveira PP, Rebouças RG, Monte TL, Fricke D. 2002. Cerebral trypanosomiasis and AIDS. *Arq Neuro-psiquiatr* 60: 730–733. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2002000500009>.
11. Wackermann PV, Fernandes R M, Elias J Jr, Dos Santos A C, Marques, W Jr, Barreira, AA. 2008. Involvement of the central nervous system in the chronic form of Chagas' disease. *J Neurol Sci* 269:152–157. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.01.006>.
12. Silva AA, Vilar PG, Souza AS, Silva RR, Rocha MS, Lannes-Vieira J. 2010. *Trypanosoma cruzi*-induced central nervous system alterations: from the entry of inflammatory cells to potential cognitive and psychiatric abnormalities. *J Neuroparasitol*. 1:1–13. DOI: 10.4303/jnp/N100901.
13. Brener Z, Andrade Z. 1979. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 464p.
14. Da Mata JR, Camargos MR, Chiari E, Machado CR. 2000. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull* 53:153–162. [10.1016/S0361-9230\(00\)00326-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00326-9).
15. Vera EAV, Sayé M, Reigada C, Damasceno FS, Silber AM, Miranda MR, Pereira CA. 2016. Resveratrol inhibits *Trypanosoma cruzi* arginine kinase and exerts a trypanocidal activity. *Int J Biol Macromol* 87:498–503. [10.1016/j.ijbiomac.2016.03.014](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.014).
16. Fernández AF, Fraga MF. 2011. The effects of the dietary polyphenol resveratrol on human healthy aging and lifespan. *Epigenetics* 6:870-874. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16499>.
17. Barnes PJ. 2013. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov* 12:543-559. DOI: [10.1038/nrd4025](https://doi.org/10.1038/nrd4025).
18. Ma C, Wang Y, Dong L, Li M, Cai W. 2015. Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF- κ B and JAK/STAT signaling pathways. *Acta Bioch Bioph Sin* 47:207-213. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu135>.
19. Trotta VL, Lee W H, Loo CY, Haghi M, Young PM, Scalia S, Traini D. 2015. In vitro biological activity of resveratrol using a novel inhalable resveratrol formulation and oxidative stress in rat alveolar macrophages. *Eur J Pharm* 491:1-12. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2015.06.033](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.033).
20. Banu SK, Stanley JA, Sivakumar KK, Arosh JA, Burghardt RC. 2016. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. *Toxicol Appl Pharmacol* 303:65-78. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.04.016>.
21. Trotta VL, Lee WH, Loo CY, Young PM, Traini D, Scaila S. 2016. Co-spray dried resveratrol and budesonide inhalation formulation for reducing spray-dried formulation. *Int. J. Pharm.* 491, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.018>.
22. Anekonda, TS. 2006. Resveratrol: A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 52:316–326. [10.1016/j.brainresrev.2006.04.004](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.04.004).

23. Dasgupta S, Bandyopadhyay M. 2013. Neuroprotective mode of action of resveratrol in central nervous system. *Pharma Nutrit.* 1:90-97 <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2013.05.006>.
24. Reiche EM, Inouye MMZ, Bonametti A M, Jankevicius JV. 1996. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento *J. Pediatría* 72:125-132.
25. Lana, M, Tafuri WL. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Neves, D. P. Parasitologia humana. 10.ed. São Paulo: Atheneu.
26. Pinto AYdN, ValenteI VC, ValenteI SAS, Figueiras ACM. 2011. Doença de Chagas congênita por infecção aguda maternal por *Trypanosoma cruzi* transmitida via oral. *Rev Pan-Amaz Saude* 2:89-94. doi: 10.5123/S2176-6223201100100012.
27. Moreira NM, Zanoni JN, de Oliveira Dalálio MM, de Almeida Araújo EJ, Braga, CF, de Araújo, SM. 2014. Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 141:68–74. doi: 10.1016/j.exppara.2014.03.005.
28. Tempone AG, Ferreira DD, Lima ML, Costa Silva TA, Borborema, ST, Remião JQ, Galuppo MK, Guerra JM, Russel AJ, Wynne GM, Lay RYL, Cadelis MM, Copp BR. 2017. Efficacy of a series of alpha-pyrone derivatives against *Leishmania (L.) infantum* and *Trypanosoma cruzi* *Europ J Med Chem* 139:947-960. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.08.055.
29. Silva AA, Roffe E, Marino AP, dos Santos PV, Quirico-Santos T, Paiva CN, Lannes-Vieira J. 1999. Chagas' disease encephalitis: intense CD8+ lymphocytic infiltrate is restricted to the acute phase, but is not related to the presence of *Trypanosom cruzi* antigens *Clin Immunol* 92:56–66. <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4716>.
30. Chuenkova MV, Pereira Perrin M. 2011. Neurodegeneration and Neuroregeneration in Chagas Disease. *Adv Parasitol* 76:195-233. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00009-8.
31. Akpan N, Caradonna K, Chuenkova MV, Pereira Perrin M. 2008. Chagas' disease parasite-derived neurotrophic factor activates cholinergic gene expression in neuronal PC12 cells *Brain Res* 1217:195–202. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.082>.
32. Frémon L. 2000. Biological effects of resveratrol *Life Sciences* 66:663–673. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00410-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00410-5).
33. Kumar V, Pandey A, Jahan S, Shukla RK, Kumar D, Srivastava A, Singh S, Rajpurohit CS, Yadav S, Khanna VK, Pant AB. 2016. Differential responses of *Trans* Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis *Scient Report* 6:28142. DOI: 10.1038/srep28142.
34. Koberle F. 1970. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis *Bull World Health Organ* 42:739–743.
35. Chuenkova MV, Pereira MA. 2000. A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. *Mol Biol Cell* 11:1487–1498.

36. Chuenkova MV, Pereira MA. 2001. The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. *Neuroreport* 12:3715–3718.
37. Aoki MP, Guiñazú NL, Pellegrini AV, Gotoh T, Masih DT, Gea S. 2004. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:206–212. [10.1152/ajpcell.00282.2003](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2003)
38. Aoki MP, Cano RC, Pellegrini AV, Tanos T, Guiñazú NL, Coso OA, Gea S. 2006. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. *Microbes Infect.* 8:1723–1731. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.010>.
39. da Silveira AB, Freitas MA, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB, Correia-Oliveira R, Reis Dd. 2009. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. *Hum Pathol* 40:244–251. doi: [10.1016/j.humpath.2008.04.025](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.04.025).
40. Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal neurogenesis in rats *J Comp Neurol* 12:319-335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>.
41. Silva, RR, Mariante RM, Silva AA, dos Santos ALB, Roffê E, Santiago H, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. 2015. Interferon-Gamma Promotes Infection of Astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 10(2):e0118600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118600>
42. Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schröter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brüstle O, Nitsch R, Zipp F, Aktas O. 2008. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nature Cell Biol* 1:385–394. Doi:10.1038/ncb1700.
43. Brener Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 4:386–396.
44. Hutton SR, Pevny LH. 2008. Isolation, Culture and differentiation of progenitor cells from the central nervous system. *Cold Spring Harb Protoc* 3:1-5. doi: [10.1101/pdb.prot5077](https://doi.org/10.1101/pdb.prot5077).
45. McLaren FH, Svendsen CN, Van der Meide P, Joly E. 2001. Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression *J Neuroimmunol* 112:35–46. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00410-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00410-0).
46. Pillat MM, Cheffer A, de Andrade CM, Morsch VM, Schetinger MR, Ulrich H. 2015. Bradykinin-Induced Inhibition of Proliferation Rate during Neurosphere Differentiation: Consequence or Cause of Neuronal Enrichment? *Cytometry Part A* 87A:929-935. DOI: [10.1002/cyto.a.22705](https://doi.org/10.1002/cyto.a.22705).

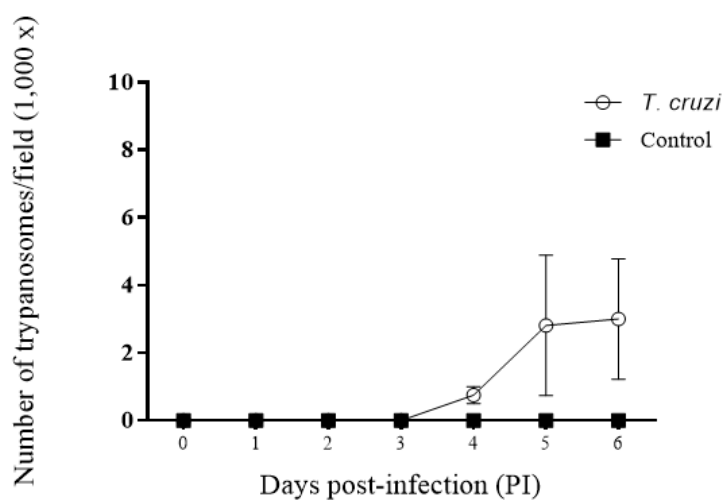


Figure 1. Course of *T. cruzi* infection. Course of *T. cruzi* infection in pregnant mice (n = 5). The infection of the animals occurred approximately on the sixth day of gestation and the animals were followed up until the 13th day of pregnancy. The *T. cruzi* infection period was six days in this experiment, and the parasitemia results were presented daily post-infection.

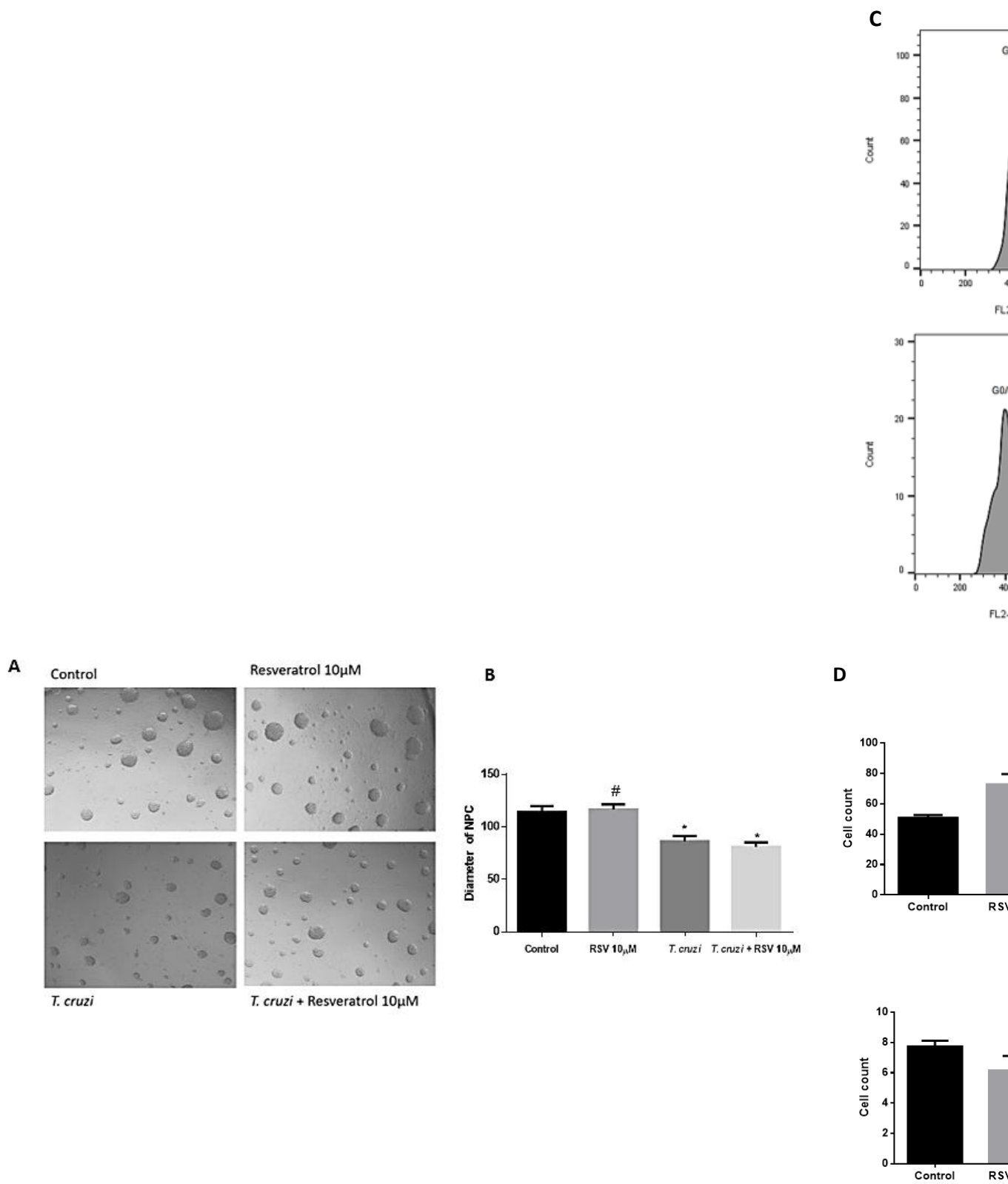


Figure 2. Effects of RSV on cell cycle of NPCs. **A:** NPCs representative morphology in *T. cruzi* cells and RSV treated cells. Scale bar 100µm. **B:** diameter of NPCs. Image quantification was done using ImageJ image software. **C:** Histogram showing cell-cycle

phases in cell populations treated or untreated (control) with RSV (10 μ M) along the whole course of proliferation. **D**: Flow cytometry analysis of cells in G₁G₀, S and G₂ phases of cell cycle. The data represents mean \pm SEM of three independent experiments using One-Way ANOVA with post-hoc Tukey test. *p<0.05 (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

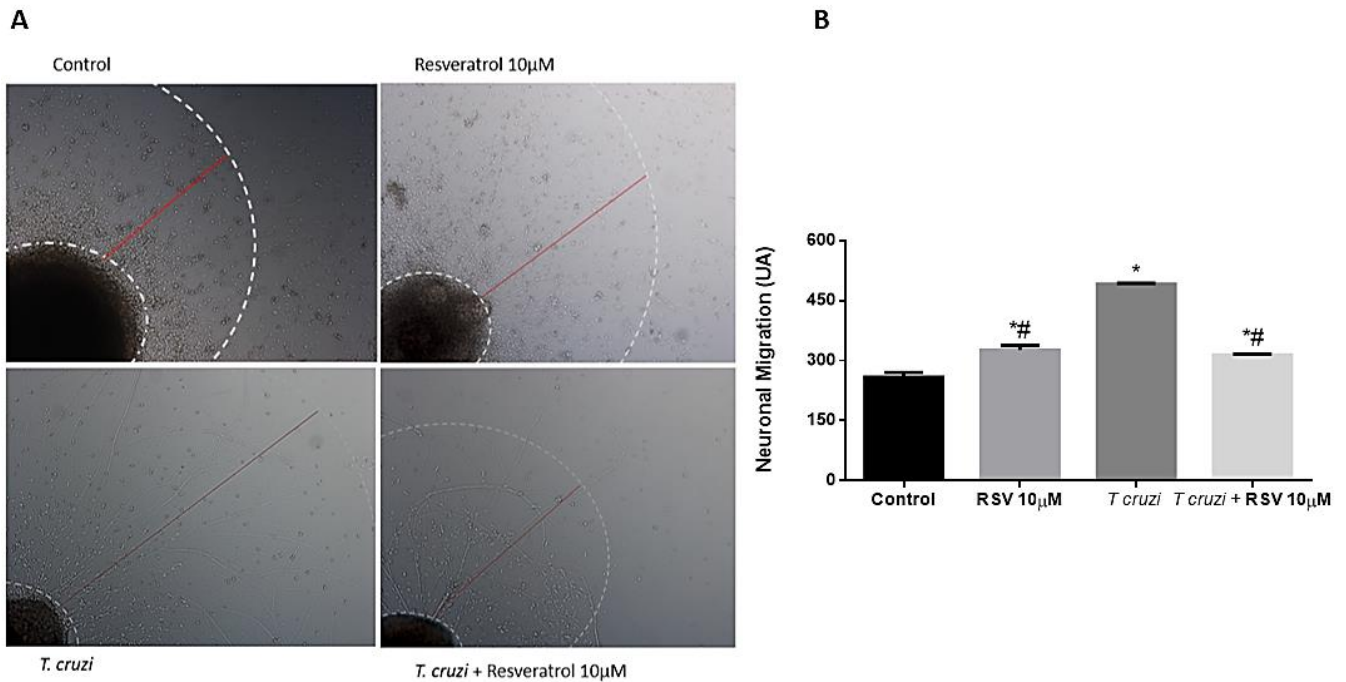
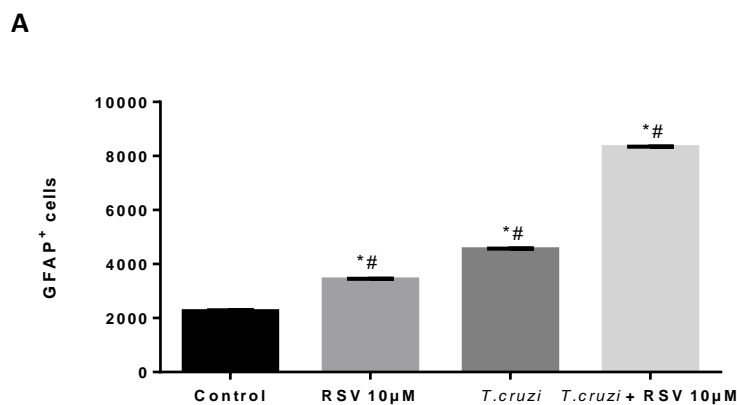


Figure 3. RSV restores the differentiation of NPCs induced by *T. cruzi* during radial migration. **A**: Neurospheres on day 7 of differentiation in uninfected and infected cells. **B**: Radial cell migration pattern in presence or absence of RSV 10 μ M. The data represents mean \pm SEM of three independent experiments using One-Way ANOVA with post-hoc Tukey test. *p<0.05 (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).



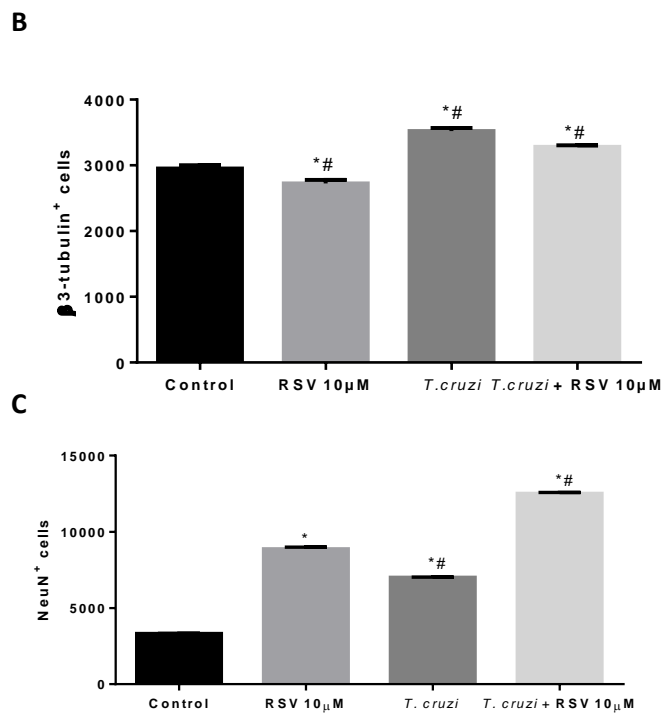


Figure 4. The RSV stimulates neurogenesis and gliogenesis during *T. cruzi* infection. Flow cytometry data comparing the percentage of cells expressing glial and neuron specific proteins in *T. cruzi* and control neurospheres in presence or absence RSV 10 μ M. **A:** Anti-GFAP. **B:** Anti- β 3-tubulin. **C:** Anti-NeuN antibodies were conjugated with AlexaFluor (AF) 488 or AF 555 fluorophores. The data represents mean \pm SEM of three independent experiments using One-Way ANOVA with post-hoc Tukey test. * p <0.05 (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

Conclusão

O estudo realizado foi capaz de demonstrar a influência do *T. cruzi* nos eventos relacionados a neurogênese e gliogênese. Através dos experimentos por citometria de fluxo foi possível comprovar a influência do parasito no que se diz respeito a estimulação da neurogênese (neurônios imaturos e maduros) em CPNs infectadas. Com relação ao ciclo celular tanto as células infectadas quanto as células que receberam tratamento com resveratrol não apresentaram resultados significativos nas fases do ciclo estudadas. Percebe-se que as células infectadas com o *T. cruzi* apresentaram um tamanho menor das neuroesferas. Portanto, com os resultados obtidos é possível concluir que o parasito embora tenha diminuído o tamanho das neuroesferas atua aumentando a neurogênese, neste sentido sugere-se novos estudos para que se evidenciem outros mecanismos possíveis que o parasito é capaz de atuar. O Resveratrol minimizou efeitos da doença sobre a neurogênese e gliogênese, porém não foi capaz de reverter os efeitos provocados pelo parasito nos processos neurogênicos nas células precursoras neurais.

Referências

- ANDRADE, G. M. Q.; GONTIJO, E. D.; PINTO, F. S. **Diagnóstico e tratamento da Doença de Chagas congênita (DCC)**. Minas Gerais. 2006. Disponível em: <<http://www.medicina.ufmg.br/edump/ped/chagas.htm>>. Acesso em: 5. jun. 2007.
- ANDREOLLO N.A, MALAFAIA O. Os 100 Anos da Doença de Chagas não Brasil. **ABCD, Arq. Bras. Cir. Cavar**. vol. 22, n. 4, p. 185-191, 2009.
- ARAS R. et al. Cerebral infarction in autopsies of chagasic patients with heart failure. **Arq. Bras. Cardiol**. vol. 81, n. 4, p. 414-416, 2003.
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. **Pathology of the human placenta**. 5th ed. Springer ScienceBusiness Media, Inc; 2006. p. 1065.
- BATISTA, R. S. et al. Neuroinfecção humana por *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Neurocienc** vol.16, n.4, p. 310-315, 2008.
- BEDIN, C. et al. A singularidade da melhoria habitacional para o controle da doença de Chagas na região noroeste do Rio Grande do Sul. **Bol. da Saúde**, v. 15, nº 1, p. 107-115, 2001.
- BORSINI, A. et al. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. **Trends Neurosci**. V.38, p. 145-157, 2015
- BOTTARI, N. B. et al. Synergistic effects of resveratrol (free and inclusion complex) and sulfamethoxazole-trimetropim treatment on pathology, oxidant/antioxidant status and behavior of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbial Pathogenesis** v. 95, p. 166-174, 2016
- BUA, J. et al. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 106, p. 623–628, 2012
- BRENER Z, ANDRADE Z. Patologia. In: Brener Z, Andrade Z. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979, 464p.
- CAMPO, V. A. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** v.7, p. 23-33, 2017

CAVALCANTE, M. P.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**. v. 37, n.1, p. 1-14. 2008.

COSTA, M. et al. Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**. v. 2, n. 1, p. 1-20, 2013.

DA MATA J.R. et al. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. **Brain. Res. Bull.** v. 53, n.2, p. 153-62, 2000.

DASGUPTA, S; BANDYOPADHYAY, M. Neuroprotective mode of action of resveratrol in central nervous system. **PharmaNutrition**. v. 1, p. 90–97, 2013.

DE LA LASTRA, C.A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions**, v.35, p. 1156–1160, 2007.

DE OLIVEIRA, A. P; et al. The role of CCR5 in chagas disease - a systematic review. **Infect. Genet. Evol.** v. 45, p. 132-137, 2016

DIAS, G. P. et al. Resveratrol: a potential hippocampal plasticity enhancer. **Oxidative. Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, p 1-14, 2012

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 25 p. 7-86, 2016.

DIAS, J.C.P., COURA, J.R. **Epidemiologia. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

DIAS, I.G. Dessoy, M.M. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**. vol. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

European Centre for Disease Prevention and Control. Assessing the burden of key infectious diseases affecting migrant populations in the EU/EEA: technical report. Stockholm: ECDC; 2014. Disponível em <<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/assessing-burden-disease-migrant-populations.pdf>> Acesso em 25 de abril de 2018.

FARZANEHFAR, P. Comparative review of adult midbrain and striatum neurogenesis with classical neurogenesis. **Neuroscience Research**. v.12, p. 1-9 2018.

FERREIRA M.S. et al. **Doença de Chagas**. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005, pp. 1195-233.

FILIPPOV, V. et al. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. **Mol. Cell. Neurosci**. v. 23, p. 373–382, 2003.

FRÉMON, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**. v. 66, n.8, p. 663–673, 2000.

GOMES AP, S.S.S. et al. Aspectos Clínicos. In: Siqueira-Batista R, Gomes AP, Corrêa AD, Geller M. **Moléstia de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007, pp. 77-90.

GOULD, E. et al. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. **Biol. Psych**. v. 48, n.8 p. 715-720, 2000

HARDISON J. L. et al. The CC Chemokine Receptor 5 Is Important in Control of Parasite Replication and Acute Cardiac Inflammation following Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun**. v. 74, p.135-143, 2005.

HARDISON, J.L. et al. Components of weasel and fox odors elicit fast wave bursts in the dentate gyrus of rats. **Behavior Brain Res**. v. 63, p.159 –165, 1994.

HERMANN E. et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitaemia and decreased production of Interferon- γ in response to parasite antigens. **J. Infect. Dis**. v.189, 1274–1281, 2004.

HOARE C.A. **The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph**. Blackwell, Oxford. 749p. 1972.

HORGUSLUOGLU-MOLOCH E. et al. Targeted neurogenesis pathway-based gene analysis identifies ADORA2A associated with hippocampal volume in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**. v. 60, p. 92-103, 2017.

HORGUSLUOGLU, E. et al. Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: a systems biology perspective. **Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet**. v.174B, p. 93-112, 2017.

INOUE, K.; GUEDES G. SC estima em 50 mil contaminados por caldo de cana. **Folha Online**. 24/03/2005.

JANG JH, Surh YJ. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. **Free Radic Biol. Med**. v.34, n. 8, p. 1100–1110, 2003.

JARDIM E.; TAKAYANAGUI O.M. Forma nervosa crônica da Doença de Chagas. **Arq. Neuropsiquiatr**. v. 51, n. 4, p. 537-540, 1993.

Jl L. et al. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. **Mol. Aspects. Med**. v. 34, p. 981-1023, 2013.

KASHIWABARA Y. B. et al. Doença de chagas - revisão de literatura - **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**. v.4, n.3, p .49-52, 2013.

KEMPERMANN G, et al. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**. v. 3 n. 386, p.493-495, 1997.

KEMPERMANN, G. **Adult Neurogenesis 2: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain**. Oxford, 2006. 167p.

KEMPERMANN, G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. **J. Neurosci.** v. 22, n. 3, p. 635-638, 2002.

KIM T.T; DYCK J.R. Is AMPK the savior of the failing heart? **Trends in endocrinology and metabolism:TEM.** v. 26, p. 40-48, 2015.

KURŠVIETIENĖ et al. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. **Medicina.** v. 52, p. 148-155, 2016.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. cap. 11.

LIU, X. et al. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. **Glia.** v.54, p.394-410, 2006.

MALBERG, J.E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J. Neurosci.** v. 20, p. 9104-9110, 2000.

MANNING, J.E., The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection. **Infect. Immun.** v74, p. 135-143, 2006.

MARTINS-MELO F.R.; et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **Plos Negl. Trop. Dis.** v. 6, n. 2, p.1-8, 2012.

MCCOLL, B.W. et al. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. **J. Neurosci.** v.28, p. 9451-9462, 2008.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol. Epidemiol.** v.46, n. 21, p. 1-9, 2015

MOGHADDAM, B. et al. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. **Brain Res.** v. 655, p.251-254. 1994

Molina, J. A. P.; Molina I. Chagas disease. **Seminar.** v.391, p. 1-13, 2017.

MONCAYO, A.; Silveira, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** p.17-30, 2009.

MONTEIRO, Silvia Gonzales. **Parasitologia na medicina veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro, Roca, 2017. 370p.

MUKHERJEE, S. et al. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose Response** v. 8, p478-500, 2010.

- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: editora Atheneu. 2005. p. 85-108.
- OLIVEIRA, M. F; et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v. 37, n 3, p. 2009-2228, 2008.
- Park, E.J.; Pezzuto, J.M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1852, p. 1071-1113, 2015.
- PEDRA, R.A.; et al. Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da doença de chagas na fase crônica. **Rev. Fac. Ciênc. Méd.** v.13, p.5-9. 2011
- PEDREIRA DE FREITAS J. L.; LION, M.F.; TARTARI J.T.A. Resultados de uma investigação sobre moléstia de Chagas realizada no município de Marília e outros, com estudo de dois casos agudos da doença. **Rev. Hosp. Clin. São Paulo**. v.8, p.81-92. 1953
- PEREIRA, G. V.; et al. Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice. **PLOS Pathogens**. v. 12, p. 1-19, 2016.
- PÉREZ, H. A. G. **Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia de tripanossomas de unglados**. 2012. Tese (Doutorado em Parasitologia) Universidade de São Paulo, SP, 2012.
- RAJ, P.; et al. T. Potential of resveratrol in the treatment of heart failure. **Life Sciences**. v. 95, p. 63-71, 2014.
- PIROLA, L.; FROJDO, S. Resveratrol: one molecule, many targets. **IUBMB Life**. v.60, p. 323–332, 2008.
- RASSI-JÚNIOR, A. et al. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**. v.26, p. 275-291, 2012.
- RASSI-JÚNIOR, A. et al. Chagas disease. **Lancet**. v. 375, p.1388-1402, 2010.
- RASSI-JÚNIOR, A. et al. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem. Inst . Oswaldo Cruz**. v.104, p. 152-158, 2009.
- REICHE, E. M. et al. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. **Jornal de Pediatria**. Londrina. v. 72, n. 3, p. 1-8, 1996.
- REQUENA-MÉNDEZ A. et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **Plos Negl. Trop. Dis**. v. 9, p. 1-15 2015.
- REY, L. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas: o parasito**. Parasitologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.cap. 11.

SADI, G.; BOZAN, D.; YILDIZ, H.B. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. **Mol. Cell. Biochem.** v. 393, p. 111–122, 2014.

SAVASKAN, E. et al. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. **Gerontology.** v. 49, p. 380-383, 2003.

SICA, R. P. Compromiso del sistema nervioso. In: Storino RA, Milei J. Enfermedad de Chagas. **Buenos Aires: Doyma**, p. 293-301, 1994.

SILVA A. S. **Atividade da adenosina desaminase, concentração de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina em ratos infectados com *Trypanosoma evansi***. 2011. 137p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

SIQUEIRA-BATISTA. R.; MORAES, H.P.; HAHN M. D. **Patogenia e patologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007, pp. 57-74.

SZKUDELSKI, T.; SZKUDELSKA, K. Potential of resveratrol in mitigating metabolic disturbances induced by ethanol. **Biomed. Pharmacother.** v. 101, p.579-584, 2018.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL R. L. **Parasitologia Veterinária** – 4. ed. 965p. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2017.

URBAN, N., GUILLEMOT, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. **Front. Cell. Neurosci.** v. 8, p. 1-19, 2014.

VALENTE, S. A. S. et al. Acometimento cardíaco em pacientes com Doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Uberaba.** v. 34, n. 5, p. 413-419, 2001.

VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature.** v. 415, p. 1030-1034, 2002.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 05 de abril de 2018.

World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015. Disponível em <<http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>>. Acesso em 07 de abril de 2018.

ANEXO A Certificado de Aprovação do CEUA/UFMS



Comissão de Ética no Uso de Animais
da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURAL EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma evansi*", protocolada sob o CEUA nº 3060040517, sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** e equipe: Mateus Fracasso; Nathieli Bianchin Bottari; Sílvia Gonzalez Monteiro - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) na reunião de 12/07/2017.

We certify that the proposal "EFFECTS OF RESVERATROL ON NEURAL DIFFERENTIATION IN EXPERIMENTALLY INFECTED MAMMALS WITH *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi*", utilizing 62 Heterogenic mice (10 males and 52 females), protocol number CEUA 3060040517, under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** and team: Mateus Fracasso; Nathieli Bianchin Bottari; Sílvia Gonzalez Monteiro - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 07/12/2017.

Finalidade da Proposta: Ensino (Desenvolv. Recursos Didáticos)

Vigência da Proposta: de 09/2017 a 12/2018 Área: Bioquímica Toxicológica

Origem:	Biotério Central UFMS				
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	50 a 60 dias
Linhagem:	Swiss			Peso:	20 a 25 g
Origem:	Biotério Central UFMS				
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	50 a 60 dias
Linhagem:	Swiss			Peso:	20 a 25 g

Resumo: Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, as células têm a tarefa de proliferar, diferenciar, migrar e morrer de modo altamente preciso. Entretanto, sabe-se que o *Trypanosoma cruzi* e também o *Trypanosoma evansi*, parasito intracelular, desempenha um papel importante modulando a determinação do destino neural. Este estudo terá como objetivo investigar o efeito do resveratrol na proliferação/auto-renovação, migração e neurogênese de células progenitoras neurais em camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma evansi*. Para isso, camundongos serão divididos inicialmente em dois protocolos experimentais de acordo com a infecção parasitária. No protocolo experimental I, os animais serão divididos em dois grupos: A (não infectados), B (infectados com *T. cruzi*). Protocolo experimental II, grupo A (não infectados), B (infectados experimentalmente com *T. evansi*). As infecções serão realizadas 7 dias após o acasalamento experimentalmente via intraperitoneal com a cepa Y de *T. cruzi* e *T. evansi*. Nos dias 11 e 12 os animais passarão por testes comportamentais (memória, ansiedade e locomoção). Treze dias após a infecção os embriões obtidos através do acasalamento das fêmeas serão removidos. O cérebro dos embriões será coletado e cultivado. A proliferação/auto-renovação, migração e neurogênese de células progenitoras neurais (CPNs) obtidas das zonas subventricular e subgranular de camundongos adultos infectados com *T. cruzi* e *T. evansi* e/ou tratados com resveratrol serão avaliadas. A diferenciação neural in vivo será avaliada pelos ensaios de incorporação de BrdU e marcação com iodeto de propilo seguidos por imunocitoquímica e citometria de fluxo para marcadores neuronais e gliais. Com este estudo, espera-se elucidar os mecanismos de ação do *T. cruzi* e *T. evansi* na regulação da diferenciação neural na doença de Chagas, bem como apresentar um composto natural, o resveratrol, como forma de tratamento da infecção a nível de SNC.

Local do experimento: Os animais serão mantidos no Biotério Prédio 20.

Santa Maria, 11 de março de 2018

Avenida Roraima, 1000, Niterói, 2º andar - CEP 97205-900 Santa Maria, RS - tel: 51 (70) 3220-6062 / fax:
Número de atendimento: 040 8330 4433 e 344 4433 ou e-mail: ceua.ufsm@gmail.com
CEUA n. 3060040517



Comissão de Ética no Uso de Animais
da
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria