



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

Nathieli Bianchin Bottari

**MECANISMOS DE AÇÃO DO RESVERATROL NA DIFERENCIAÇÃO
NEURAL IN VITRO E NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii***

**Santa Maria, RS, Brasil
2018.**

Nathieli Bianchin Bottari

**MECANISMOS DE AÇÃO DO RESVERATROL NA DIFERENCIAÇÃO
NEURAL IN VITRO E NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii***

Tese apresentada ao 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 para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-orientadora: Dr^ª Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, RS, Brasil
2018.

BOTTARI, NATHIELI
MECANISMOS DE AÇÃO DO RESVERATROL NA DIFERENCIAÇÃO
NEURAL IN VITRO E NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii* / NATHIELI
BOTTARI.- 2018.
181 p.; 30 cm

Orientador: Aleksandro Da Silva
Coorientadores: Maria Rosa Schetinger, Micheli Pillat
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2018

1. *Toxoplasma gondii* 2. Resveratrol 3. Sistema
purinérgico 4. P2X7 5. Neurogênese I. Da Silva,
Aleksandro II. Schetinger, Maria Rosa III. Pillat.

Sistema de Informação em Biblioteca de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(s). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Fatta 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 Tese de Doutorado

**MECANISMOS DE AÇÃO DO RESVERATROL NA DIFERENCIAÇÃO
NEURAL IN VITRO E NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii***

elaborada por

Nathieli Bianchin Bottari

como requisito para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Denis Rosemberg
(1º membro da banca - UFSM)

Prof. Dr. Luís Antônio Sangioni
(2º membro da banca - UFSM)

Prof. Dra. Virginia Cielo Rech
(3º membro da banca - UFN)

Prof. Dra. Michele Sagrillo
(4º membro da banca - UFN)

Santa Maria, 24 de setembro de 2018.

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida:

*meus pais Claudio e Rosane que nunca mediram esforços para investir
nos meus sonhos e sempre estiveram ao meu lado
dando-me apoio, zelo, carinho e amor incondicional.
Vocês são a razão para que eu continue em frente!*

AGRADECIMENTOS

Dizer obrigada, às vezes, não é suficiente para agradecer a tantas pessoas que se fazem presente nos momentos mais difíceis das nossas vidas, que nos estendem a mão amiga e nos oferecem amparo. Sozinho ninguém vive, apenas sobrevive.

Primeiramente agradeço a Deus, por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida, por ter me dado coragem e determinação, por guiar minhas decisões, iluminar meu caminho, fazer com que os obstáculos fossem superados e eu conquistasse esse objetivo.

Agradeço de modo especial aos meus pais, Clandio e Rosane e a minha família, pelo amor, bons exemplos, incentivos e por compartilharem comigo momentos de alegria e infelicidades. Afinal, uma alegria compartilhada transforma-se em uma dupla alegria; e uma tristeza compartilhada em meia tristeza. Não existem palavras para dar significado a tudo isso. Amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva, por toda a confiança, paciência e ensinamentos em mim depositados. Agradeço por partilhar seus conhecimentos, colocando em minhas mãos as ferramentas com as quais permitiu-me abrir novos horizontes, rumo à satisfação plena dos ideais humanos e profissionais, e por quem hoje, eu o tenho como exemplo para continuar nessa jornada.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Maria Rosa Chitolina Schetinger, por todo carinho e acolhimento desde o meu primeiro dia no laboratório. Obrigada por contribuir e orientar meus estudos e ser meu espelho de profissional sábio e humano.

À minha amiga Micheli Pillat, sua ajuda e apoio foram muito importantes para mim. Como é bom ter alguém que traz paz em meio ao caos, assim é você, uma luz no final do meu túnel. Estendo meu agradecimento ao Prof. Dr. Henning pela dedicação em nossa parceria e incentivo nos trabalhos sobre “neurogênese”. Ninguém contrói nada sozinho ainda que esteja em uma ilha isolada.

Meus agradecimentos às Prof. Dr^a Vera Morsch, Prof. Dr^a Cinthia Melazzo e Prof. Dr^a. Sílvia Monteiro pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seus laboratorios (Enzitox, Lapavet - UFSM), vocês são grandes mulheres da ciência e foram essenciais para meu crescimento científico e pessoal, admiro muito vocês.

Agradeço aos colegas de laboratório e amigos (Taís, Karine, Ani, Mateus, Charles, Fabiano, Jessié, Naiara, as Vanessinhas, Thauan, Thalison, Mari, Pauline, Milagros, Vitor, Luana, Ali, Letícia, Juci, Diéssica, Angélica) vocês fazem parte desse momento. Obrigada pelo

carinho, pela força, pela ajuda incansável nos experimentos, pelo companheirismo e momentos inesquecíveis que passamos juntos. Levo comigo as cores da alegria que cada amizade pintou em minha vida.

Aos amigos, recentes e de longa data, próximos e distantes, vocês me motivaram a não desistir e a não ser do tamanho da minha prisão, mas sim do tamanho da minha vontade.

Agradeço à banca examinadora pela atenção e disponibilidade em avaliar esta tese, cujas contribuições darão maior credibilidade a este estudo ao qual dediquei três anos e seis meses durante o doutorado. Obrigada!

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, número processo 88887.186030/2018-00) pelo suporte institucional e financeiro concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Continuarei a evoluir durante toda a minha vida. Se aprendo uma nova aptidão, levo-a o mais longe possível. Adapto-me rapidamente à mudança. Se não sou bom numa coisa à primeira tentativa, tudo bem. Gosto do desafio. A atividade é que me faz vicejar, apenas com uma dose módica de inação.”

(Deepak Chopra)

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

MECANISMOS DE AÇÃO DO RESVERATROL NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL IN VITRO E NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii*

Autora: Nathieli Bianchin Bottari

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-orientadora: Dr^ª Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, 24 de setembro de 2018.

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) envolve eventos que incluem a proliferação de células precursoras neurais (CPNs) que se diferenciam e migram em um processo controlado a fim de formar conexões e redes funcionais. Neste contexto, sabe-se que o *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular neurotrópico e pode exercer um papel importante influenciando a determinação do destino neural. Além disso, o *T. gondii* é capaz de ocasionar a neurotoxoplasmose em humanos, induzir ao aborto espontâneo além de provocar alterações comportamentais e danos oxidativos às células do hospedeiro. Entretanto, o mecanismo subjacente à neuropatogênese da toxoplasmose permanece elusivo. Recentemente, o sistema purinérgico emergiu como uma importante via de sinalização na resposta imune contra diferentes infecções, incluindo a toxoplasmose. A ligação de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, em especial a adenosina trifosfato (ATP) e a adenosina (ADA) a seus receptores P2X7, P2Y₁, A₁ e A_{2A} estimulam a ativação de células microgлияis, bem como a secreção de citocinas pró e antiinflamatórias contribuindo para a resposta imune contra o parasito. Considerando que a toxoplasmose é uma doença parasitária com ampla distribuição mundial, grande potencial zoonótico e difícil tratamento, essas hipóteses motivaram o objetivo deste estudo que foi investigar os efeitos do resveratrol (RSV), um potente antioxidante e antiinflamatório naturalmente encontrado em uvas, sobre a atividade de enzimas envolvidas na neurotransmissão cerebral, bem como avaliar seus efeitos na proliferação/auto-renovação, migração e neurogênese de CPNs obtidas de embriões infectados com *T. gondii*. Para explorar o papel do *T. gondii* no desenvolvimento das células-tronco, as CPNs foram isoladas de embriões obtidos de camundongos prenhas experimentalmente infectadas com cepa VEG de *T. gondii*. Dessa forma, as CPNs proliferam na presença de fatores de crescimento tornando-se multipotentes e formando neuroesferas. Os resultados experimentais demonstraram que o *T. gondii* aumenta a proliferação e a migração de CPNs, além de estimular a gliogênese em detrimento da neurogênese na condição da infecção. Dentre as concentrações de RSV testadas, 1µM e 10µM exerceram melhores efeitos sobre a neurogliogênese de CPNs infectadas. Além disso, a infecção por *T. gondii* alterou – aumentou a atividade da enzima NTPDase e reduziu a atividade da ADA em CPNs infectadas, aumentando a expressão do receptor P2X7 e reduzindo a expressão do receptor A_{2A} de adenosina. Essa modulação na atividade das enzimas e dos receptores estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células do hospedeiro contribuindo para o processo inflamatório no SNC. Entretanto, o tratamento com RSV foi capaz de reduzir a atividade das enzimas NTPDase e ADA inibindo o receptor P2X7 e estimulando o transporte de adenosina para o meio intracelular via receptor A_{2A}, diminuindo a viabilidade celular. Camundongos adultos infectados por *T. gondii* apresentaram um aumento na atividade das enzimas NTPDase e 5'-NT, porém uma redução na atividade da ADA foi observada. Os resultados sugerem uma maior hidrólise do ATP, o qual se liga aos receptores P2X7 e P2Y₁. O RSV ainda, exerceu seu efeito neuromodulador ao reduzir a atividade das enzimas analisadas e a densidade dos receptores purinérgicos. No curso da infecção, a ADA extracelular liga-se aos receptores A₁ e A_{2A} de adenosina, os quais são modulados pelo RSV de modo a prevenir o dano oxidativo. A transmissão materno fetal do *T. gondii* induz a um comportamento do tipo ansiogênico com perda de memória. Mais uma vez, o RSV exerceu neuroproteção reparando as alterações comportamentais observadas. Juntos, os resultados deste estudo propõem a ativação da sinalização purinérgica pelo *T. gondii* e demonstram os efeitos antiinflamatório e neuroprotetor mediado pelo RSV sugerindo esta molécula como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da neurotoxoplasmose.

Palavras-chave: *T. gondii*, CPNs, resveratrol, ectonucleotidases, P2X7, citocinas.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Post-Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ACTION MECHANISMS OF RESVERATROL IN VITRO NEURAL DIFFERENTIATION AND PURINERGIC SIGNALLING IN MICE INFECTED WITH *Toxoplasma gondii*

Author: Nathieli Bianchin Bottari
Advisor: Aleksandro Schafer Da Silva
Co-advisor: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-advisor: Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, September 24, 2018.

Central nervous system (CNS) development involves events that include the proliferation of neural precursor cells (NPCs) that differentiate and migrate in a process for creating connections and networks. In this context *Toxoplasma gondii* is an intracellular neuropathic parasite capable of influencing neural fate. *T. gondii* can cause neurotoxoplasmosis in humans, induces abortus, behavioral alterations and oxidative damage in host cells. However, the mechanism underlying neuropathogenesis in cerebral toxoplasmosis remains elusive. The purinergic system has recently emerged with significant signalling in the immune response against infections, including toxoplasmosis. The binding of extracellular nucleotides and nucleosides, especially adenosine trifosfate (ATP) and adenosine (ADO) to their P2X7, P2Y1, A1 and A_{2A} receptors stimulate the activation of microglial cells as well as a pro and anti-inflammatory cytokines secretion contributing to the immune response against the parasite. Toxoplasmosis is a worldwide disease, with great zoonotic potential and difficult treatment; thus these hypotheses motivated the aim of this study. In the present study, we investigated the effects of resveratrol (RSV), a potent natural anti-inflammatory and antioxidant molecule found in grapes, in brain neurotransmission, as well as in proliferation/migration and neurogenesis of NPCs in embryos infected with *T. gondii*. For gain insights in the role of *T. gondii* during development of the neural stem cells, the NPCs were obtained from infected embryos using VEG strain of *T. gondii*. Thus, as NPCs proliferate in the presence of growth factors becoming multipotent and forming neurospheres. The results demonstrate that *T. gondii* increases the proliferation and migration of NPCs besides stimulating the glyogenesis to the detriment of neurogenesis. Among the concentrations tested, 1 and 10µm RSV exerted the struggles on the critical effect of NPCs. In addition, *T. gondii* infection modulated the activity of NTPDase and ADA enzymes in infected NPCs; an overexpression of P2X7 receptor and down expression of the A_{2A} receptor were observed in infected NPCs. This modulation on the activity of enzymes stimulates the production of proinflammatory cytokines by host cells contributing to the inflammatory process. However, the treatment with RSV was able to reduce the activity of the NTPDase and ADA enzymes by inhibiting the P2X7 receptor and stimulated the transport of ADO to the intracellular medium via the A_{2A} receptor, reducing cellular viability. Adult mice infected with *T. gondii* increased NTPDase and 5'-NT activities, but a reduction in ADA enzyme was observed. The results obtained are a greater hydrolysis of ATP, which binds to P2X7 and P2Y1 receptors. RSV exerted its neuromodulatory effect regulating ectonucleotidase enzymes and purinergic density receptors. Furthermore, RSV modulates extracellular adenosine binds to the A1 and A_{2A} receptors and decrease oxidative damage. Fetal maternal transmission of *T. gondii* induces a depressive-like behavior and memory loss. Again, RSV exerts neuroprotection by repairing behavioral changes. Together, the results of this study propose the activation of purinergic signalling by *T.gondii* and demonstrate the neuroprotective effect mediated by RSV, suggesting this molecule as therapeutic potential for the treatment of neurotoxoplasmosis.

Keywords: *T. gondii*, NPCs, resveratrol, ectonucleotidases, P2X7, cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formação do tubo neural.....	26
Figura 2 – Migração de células neuroepiteliais e células gliais	27
Figura 3 – Representação esquemática da neurogênese hipocampal	29
Figura 4 – Estágios de desenvolvimento no curso da neurogênese hipocampal	31
Figura 5 – Mecanismos de liberação, degradação e recaptção do ATP.....	35
Figura 6 – Diagrama esquemático da sinalização do receptor P2.....	37
Figura 7 – Cascata de enzimas purinérgicas e receptores	38
Figura 8 – Sinalização purinérgica no desenvolvimento embrionário e adulto	44
Figura 9 – Distribuição geográfica dos genótipos de <i>T. gondii</i>	46
Figura 10 – Formas infectantes de <i>T. gondii</i>	49
Figura 11 – Mecanismo de invasão de <i>T. gondii</i> em células hospedeiras	51
Figura 12 – Ciclo Biológico de <i>T. gondii</i>	53
Figura 13 – Mecanismo de defesa do hospedeiro frente a infecção por <i>T. gondii</i>	55
Figura 14 – Ação do ATPe na resposta de macrófagos ativados por <i>T. gondii</i>	56
Figura 15 – Estruturas químicas dos isômeros <i>trans</i> - resveratrol e <i>cis</i> -resveratrol	60
Figura 16 – Vias de regulação ativadas pelo RSV	62
Figura 17 – Vias de ação moduladas pelo <i>T. gondii</i> e RSV <i>in vitro</i>	156
Figura 18 - Sinalização purinérgica e alterações comportamentais <i>in vivo</i>	158

ARTIGO E MANUSCRITOS

ARTIGO 1

Figure 1 - Maternal-fetal transmission of *T. gondii* consistent with congenital toxoplasmosis. 1: Specific band (± 300 bp, indicated by the arrow) of *T. gondii* DNA detected by qualitative PCR in the brain of infected female mice. 2: *T. gondii* DNA in telencephalon of embryos (E13). 3: Negative control. Agarose gel (1.5%) stained with ethidium bromide showing specific amplicons. M: molecular weight marker 1000 bp89

Figure 2 - Effects of resveratrol on numbers and size of neurospheres. A: Uninfected and infected NPCs proliferate as neurospheres after 5 days of growing in presence or absence of RSV (0.1 to 100 μ M). Scale bar: 100 μ m. B: RSV treatment increased the numbers of neurosphere in uninfected NPCs. Neurosphere counts were performed using flow cytometry. C: Sizes of uninfected and infected neurosphere after treatment with RSV (1 and 10 μ M). The sizes were determined with the ImageJ software. Data are expressed as mean values \pm SEM using Two-Way ANOVA with post-hoc Tukey tests within the GraphPad Prism software; significant differences $p < 0.05$. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups)90

Figure 3- Resveratrol-induced increases on proliferation and viability of infected NPCs. A: Flow cytometry analysis of cells in Sub G1, G0/G1, S, and G2/M phases of cell cycle of uninfected and infected treated with RSV (1 and 10 μ M). B: Percentages of cellular viability/mitochondrial activity in relation to control cells in the absence and presence of RSV (1 and 10 μ M). Data represent mean values \pm SEM of three independent experiments using Two-Way ANOVA with the post-hoc Tukey test. * $p < 0.05$ (* Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group)91

Figure 4 - Resveratrol-induced decrease in radial migration of infected NPCs. A: Phase contrast images representing radial migration pattern after 7 days of neural differentiation in the presence or absence of RSV in uninfected and infected NPCs. The region comprised by the dotted lines corresponds to approximately 95% of migrating cells. B: Quantification of migration of uninfected and infected NPCs treated with RSV (0.1 to 10 μ M). The quantification was done using ImageJ software and expressed as percentage. Significant results $p < 0.05$, using Two-Way ANOVA with the post-hoc Tukey test. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups)92

Figure 5- Neural progenitor differentiation induced by *T.gondii*. A: GFAP expression in differentiated neurospheres from uninfected and infected NPCs treated with RSV (0.1 to 10 μ M). B: β 3-tubulin expression by in uninfected and infected NPCs treated with RSV (0.1 to 10 μ M). C: Typical immunofluorescence merged images of neurospheres on day 7 of differentiation, showing glial (GFAP) and neuronal β 3- tubulin expression93

Figure 6- Resveratrol restored neurogliogenesis during *T. gondii* infection. Flow cytometry analysis using specific antibodies conjugated with Alexa Fluor (AF) 488 or AF 555 fluorophores in uninfected and infected NPCs treated with different concentrations of RSV (1 and 10 μ M). Percentages of A: NPCs (Nestin marker). B: Glial cell (GFAP+ cells). C: immature neurons (β 3-tubulin⁺ cells). D: Percentages of mature neurons (MAP2).94

MANUSCRITO 1

Figure 1 - RSV-induced promotion of NPC growing and glial differentiation induced by *T. gondii* in NPCs. A: The images show NPC morphologies of control and infected, which had been treated or not with RSV. Scale bars 100µm. B: Diameter of NPCs. Image quantification was done using ImageJ software. *p <0.05 (*Control vs infected group). C: Percentages of glial cells (GFAP⁺cells) in control and infected neurospheres following RSV (10µM) treatment. D: Histograms showing cell-cycle phases of infected NPC populations treated or not with 10µM RSV (1µM). E: Flow cytometry analysis of cells in G0/G1, S, G2/M phases of cell cycle of undifferentiated NPCs. The data represents mean ± 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)114

Figure 2- Influence of *T. gondii* on E-NTPDase (hydrolyzing ATP and ADP), 5' nucleotidase (hydrolyzing AMP) and ADA activities (hydrolyzing ADO) in control and infected differentiated neurospheres treated with RSV (10µM). The data represent mean ± SEM of three independent experiments analyzed by One-Way ANOVA with the post-hoc Tukey test. *p<0.05 (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group)115

Figure 3- Effects of RSV on purinergic receptors during immune responses developed by *T. gondii* in differentiated NPCs. A: Number of P2X₇ receptor-positive cells (P2X₇⁺cell) in control and infected neurospheres. B: Number of A_{2A} receptor-positive cells (A_{2A}⁺cell) in control and infected neurospheres treated with 10µM RSV. The data represent mean ±SEM of three independent experiments. **p<0.01(*Control vs infected group); (#Infected vs experimental group)116

Figure 4- Effects of RSV on cytokine gene expression profiles of differentiated NPCs infected with *T. gondii*. A: anti-inflammatory IL-1β interleukin. B: anti-inflammatory IL-6 interleukin. C: interferon gamma (INF-γ) cytokine D: tumor necrosis factor alpha (TNF-α) cytokine E: pro-inflammatory IL-10 interleukin. **p<0.01; *p<0.05 (*Control vs infected group);(#Infected vs experimental group)117

Figure 5- Graphical Abstract118

MANUSCRITO 2

Figure 1 – Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), 5'-nucleotidase (5'-NT), and adenosine deaminase (ADA) activities in cortex from *T. gondii*-induced infection treated with RSV using ATP (A), ADP (B), AMP (C), and adenosine (D) as a substrate. 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).....136

Figure 2 - Western blot quantification of P2X₇ (A), P2Y₁ (B), A₁ (C), A_{2A} (D) receptors in total membranes of the cerebral cortex of mice treated with RSV and infected by *T. gondii*. β -actin was used as a loading control to normalize protein levels. Values are expressed as the mean \pm S.E.M. (* $p < 0.05$, $n=3$). One-Way ANOVA with post-hoc Tukey test. (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).....137

Figure 3 – RSV restore oxidative damage in cerebral cortex induced by *T. gondii*. A: Intracellular reactive species production by 2'-7'-dichlorofluorescein levels in the cerebral cortex of *T. gondii*-induced mice treated with RSV. B: Lipid oxidation measure by thiobarbituric acid reactive substances in the cerebral cortex of *T. gondii*-induced mice treated with RSV. The data represents mean \pm SEM. One-Way ANOVA with post-hoc Tukey test. (* $p < 0.05$, $n=5$)(* Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).....137

Figure 4 – Work hypothesis.....138

MANUSCRITO 3 – RESULTADOS PARCIAIS

Figure 1- *T. gondii*-infection alters behavior of newborn mice spent less time in open arms by plus-maze open test. A: Latency time in open arms (white color) and close arms (grey color) spent in elevated plus-maze task. B: Number of entries in open and closed arms. CT (control group); RSV (resveratrol group); INF (infected group); INF+RSV (infected and treated group). Data are presented as mean \pm SEM using ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $p < 0.05$, $n=8$). (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group)150

Figure 2- RSV promotes short and long-exploratory memory in newborn mice infected by *T. gondii*. A: number of familiar and new object recognition 4 hs after training test B: number of familiar and new object recognition 24 hs after training test. CT (control group); RSV (resveratrol group); INF (infected group); INF+RSV (infected and treated group). Data are presented as mean \pm SEM using ANOVA followed by Tuckey's post hoc test (* $p < 0.05$, $n=8$). Different letters indicate significant differences between familiar and new object); (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group)150

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Modelo de tratamento para infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes e na infecção congênita58

MANUSCRITO 3 – RESULTADOS PARCIAIS

Tabela 1 - Parameters evaluated in motor test observation by open-field test150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A1** – Receptor de ligação para adenosina
- A_{2A}** – Receptor de ligação para adenosina
- A_{2B}** - Receptor de ligação para adenosina
- A3** - Receptor de ligação para adenosina
- A4** - Receptor de ligação para adenosina
- ADA** - Adenosina desaminase
- ADO** - Adenosina
- ALPHOS** - Fosfatase alcalina
- ADP** - Adenosina difosfato
- AKT** - Proteína quinase B
- AMP** - Adenosina monofosfato
- AMPc** - Monofosfato ciclíco de adenosina
- ATP** - Adenosina trifosfato
- ATPe** - Adenosina trifosfato extracelular
- B27**- Fator de crescimento B 27 (do inglês *brain factor 27*)
- BHE** - Barreira hematoencefálica
- Ca²⁺** - Cálcio divalente
- CA3** - *Cornu ammonis* 3 do hipocampo
- CD39** - Diferenciação de cluster 39 (do inglês *Cluster Differentiation 39*)
- CD73** – Diferenciação de cluster 73 (do inglês *Cluster Differentiation 73*)
- CAST** - Cepa de *T. gondii*, tipo I
- CAT** - Catalase
- CDs** - Células dendríticas
- CPNs** - Células precursoras neurais
- CREB** - Fator de transcrição celular
- CTNP** - Células precursoras neurais primárias
- COX** - Ciclooxygenase
- DCX**- Doublecorticotina
- DNA** - Ácido desoxiribonucleico
- E-13** - 13º dia de gestação
- EGF** - Fator de crescimento epidermal

E-NPP - Ectonucleotideo pirofosfatase e/ou fosfodiesterases

E-NTPDase - Ectonucleosideo trifosfato difosfohidrolases

E-5'-NT - Ecto-5'-nucleotidasas

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ERK - Proteínas quinases ativadas por estresse

FGF - Fator de crescimento fibrilar

G1- intervalo 1 (do inglês *GAP 1*)

G2 - intervalo 2 (do inglês *GAP 2*)

GABA - Ácido gama aminobutírico

GD - Giro denteado

GFAP - Proteína fibrilar glial ácida

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

GPX – Glutathione peroxidase

Gq – Proteína quinase G

GRA – Grânulos densos

³H-TIMIDINA- Timidina triciada

HD - Hospedeiro definitivo

HI - Hospedeiro intermediário

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL-1 β - Interleucina-1 beta

IL-6 - Interleucina-6

IL-10 - Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

INF- γ - Interferon – gama

JNK - Proteínas N terminais quinases

K⁺ - Potássio monovalente

LPS - Lipopolissacarídeo

M - Mitose

MAP2 - Proteínas associadas à microtúbulos

MAPK - Proteínas quinases ativadoras de mitógeno

ME49 - Cepa de *T. gondii*, tipo II

MIC-2 - Antígeno parasitário de *T. gondii*

MIC - Micronema

MHC - Complexo de histocompatibilidade

MYD88 - Proteína 88 de diferenciação mielóide a resposta imune primária

Na⁺ - Sódio monovalente

NeuN - Proteína nuclear neuronal

NFκB - Factor nuclear kappa B

ON - Óxido nítrico

P1R - Receptor adenosina

P2R - Receptor de ATP

P2X7 - Receptor de ligação para ATP

P2Y₁ - Receptor de ligação para ATP e AMP

P2Y₂ - Receptor de ligação para ATP

PCR-RFLP - Reação em cadeia da polimerase- fragmentos de restrição de polimorfismos

PI3K - Fosfatidilinositol- 3- quinase

PKA - Proteína quinase A

PNQs - Progenitor queiscente

RH - Cepa de *T. gondii*, tipo I

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RSV - Resveratrol

ROP - Roptrias

S - Síntese

SAG - Antígenos de superfície

SIRT - Gene de codificação para histona desacetilase

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

TRL - Receptor de reconhecimento celular

VEG - Cepa de *T. gondii*, tipo III

VEL - Cepa de *T. gondii*, tipo I

VNUT - Transportadores de nucleotídeos vesiculares

WHO - *World health organization* (do inglês Organização Mundial da Saúde)

ZSG - Zona subgranular

ZSV - Zona subventricular

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....184

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	24
1.1. NEUROGÊNESE PESPECTIVA HISTÓRICA	25
1.2 ORIGEM DAS CÉLULAS ESTAMINAIS NURASIS	25
1.3 PROLIFERAÇÃO E MATURAÇÃO CPNS	20
1.4 NEUROESFERAS COMO MODELO DE NEUROGÊNESE	32
1.5 FATORES QUE AFETAM NEUROGÊNESE	33
1.6 SISTEMA PURINÉRGICOS	34
1.6.1 Armazenamento, liberação e hidrólise de ATP e nucleotídeos	34
1.6.2 Receptores purinérgicos	36
1.6.3 Ectonucleotidasas	38
1.6.4 Adenosina desaminase	39
1.7 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA NEUROINFLAMAÇÃO	41
1.8 NEUROGÊNESE, NEUROINFLAMAÇÃO E NUCLEOTÍDEOS	43
1.9 TOXOPLASMOSE: EPIDEMIOLOGIA DA INFECCÃO	46
1.9.1 <i>T. gondii</i>: origem e classificação taxonômica	48
1.9.2 Formas infecciosas	48
1.9.3 Ciclo biológico	52
1.9.4 Linhagens clonais	53
1.9.5 Subversão da resposta imune por <i>T. gondii</i>	54
1.9.6 Estimulação do sistema purinérgicos por <i>T. gondii</i>	55
1.9.7 Toxoplasmose tem tratamento?	57
1.10 RSV: HISTÓRICO E POTENCIAL TERAPÊUTICO	59
1.10.1 Propriedades neuroprotetoras do resveratrol nas células	62
2. OBJETIVOS	64
2.1 Objetivo geral	64
2.2 Objetivos específicos	64
3. ARTIGOS e MANUSCRITOS	65
3.1 Artigo 1	65
3.2 Manuscrito 1	95
3.3 Manuscrito 2	119
3.4 Manuscrito 3	139
4. DISCUSSÃO	151

5. CONCLUSÕES	160
6. PERSPECTIVAS	162
7. REFERÊNCIAS	163
ANEXO I	184

APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem esta tese estão apresentados sob a forma de artigos originais publicados em revistas internacionais e manuscritos em fase de preparação, o qual se encontra no item Artigo e Manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo ou manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta tese e apresenta interpretações e comentários gerais sobre os artigos e manuscritos contidos neste trabalho.

As Referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Discussão desta tese.

A seguir encontra-se uma lista com as publicações aceitas ou em fase de submissão/preparação:

- 1) Nathieli B. Bottari, Maria Rosa C. Schetinger, Micheli M. Pillat, Thais V. Palma, Henning Ulrich, Mariana S. Alves, Vera M. Morsch, Cinthia Melazzo, Luiz Daniel de Barros, João Luis Garcia, Aleksandro Schafer Da Silva. **Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogliogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii***. *Molecular Neurobiology* (2018) 1559-1182. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1180-z>
- 2) Nathieli B. Bottari, Micheli M. Pillat, Maria Rosa C. Schetinger, Karine P. Reichert, Tais V. Palma, Charles Elias Assaman, Henning Ulrich, Anielen Dutra, Vera M. Morsch, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Cinthia Melazzo, Aleksandro Schafer Da Silva. **Resveratrol -mediated reversal of changes in the purinergic signaling system and immune response caused by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells**. Em revisão pelo periódico *Purinergic Signalling*.
- 3) Nathieli B. Bottari, Karine Paula Reichert, Mateus Fracasso, Anielen Dutra, Maria Rosa C. Schetinger, Vera M. Morsch, Aleksandro Schafer Da Silva. **Modulation of purinergic signalling mediated by resveratrol in mice infected by *Toxoplasma gondii*: host cell defense mechanism**. Submetido para o periódico *Cellular Signalling*.
- 4) Nathieli B. Bottari, Karine Paula Reichert, Mateus Fracasso, Anielen Dutra, Maria Rosa C. Schetinger, Vera M. Morsch, Aleksandro Schafer Da Silva. **Resveratrol provides neurobehavioral and neurogenesis in newborn mice infected by *Toxoplasma gondii***. Resultados parciais em fase de preparação.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) envolve eventos morfogenéticos altamente precisos, onde as células precursoras neurais (CPNs) pluripotentes derivadas de células-tronco neurais primárias (CTNP) são capazes de auto-renovação e diferenciação, formando uma placa neural anatomicamente simples, mas com estruturas funcionalmente integradas e muito complexas. Esse processo, envolve inicialmente a proliferação de CPNs e a subsequente diferenciação de duas principais linhagens celulares que integram o SNC de um mamífero: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (derivadas de células-tronco precursoras) ou micróglia (derivado de células imunes). Em seguida, as células migram durante a formação do tubo neural, sofrem mielinização e finalmente formam as sinapses e as redes neuronais que constituem os sistemas de neurotransmissão.

Com centenas de bilhões de neurônios formando infindáveis conexões entre si, o cérebro é capaz de processar uma quantidade gigantesca de informações que chegam todos os segundos, aos órgãos. Assim, quando patógenos extracelulares ultrapassam a barreira hematoencefálica, a exemplo do parasito intracelular *Toxoplasma gondii*, e atingem o SNC de um mamífero, o cérebro rapidamente conduz diferentemente a diferenciação celular e inicia um processo de resposta imunológica na tentativa de combater o parasito.

Contudo, a inflamação e conseqüentemente o estresse oxidativo provocados pela infecção por *T. gondii* promovem a apoptose de CPNs constituindo um dos mecanismos moleculares responsáveis pelos distúrbios cognitivos e desordens neurais desencadeados pelo parasito em humanos, especialmente em recém-nascidos.

Diante da potencial gravidade das manifestações da toxoplasmose em imunodeprimidos e gestantes, bem como defeitos congênitos e toxicidade ocasionada pelos quimioterápicos disponíveis, se faz necessário à busca por novas drogas capazes de minimizar os efeitos colaterais e de combater o parasito. Nesse estudo utilizamos o resveratrol, um composto natural com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já bem elucidadas.

Mesmo que pequenos, comparados com a complexidade da infecção desempenhada pelo *T. gondii* no SNC, os resultados apresentados nesta tese adicionarão novos ingredientes as perguntas “Como o *T. gondii* dirige a neurogênese embrionária?”, “Qual o envolvimento do sistema purinérgico na neurogênese e na neurotoxoplasmose?” e por fim, “Poderia o resveratrol agir como um alvo terapêutico neuroprotetor modulando a inflamação no SNC de animais infectados?”

1.1 NEUROGÊNESE: UMA PERSPECTIVA HISTÓRICA

Desde os primórdios da neurociência no final do século IX, assumiu-se que o SNC dos mamíferos era um sistema estruturalmente estável e incapaz de regenerar-se ao longo da vida de um adulto. Entretanto, se sabe que a plasticidade cerebral; ou seja, a capacidade adaptativa do SNC em modificar-se e adaptar-se a estímulos ambientais e a novas experiências ocorre constantemente (KOCK et al., 2018).

Devido à imensa complexidade do cérebro, Santiago Ramón y Cajal (1928), primeiro neurocientista da história, acreditava que a neurogênese; ou seja, o processo de formação de novos neurônios que acontece no nosso cérebro, ocorria somente durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos e não se estendia a vida adulta. Entretanto, na década de 1960, estudos utilizando métodos recém introduzidos de autorradiografia de timidina triciada (^3H -timidina) desafiaram essa visão. A timidina triciada é absorvida por células submetidas à síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) em preparação para a mitose e, portanto, pode ser usada como um marcador para células em proliferação tanto em tempos de sobrevivência curtos, quanto em tempos de sobrevivência mais longos (SIDMAN; MIALE; FEDER, 1959).

Utilizando esse método, Altman (1962, 1963, 1966, 1969) *ibidem* Altman e Das (1965) relataram novos neurônios no cérebro de ratos e gatos adultos nas regiões do bulbo olfatório, do hipocampo e do córtex cerebral. Quinze anos depois, Kaplan examinou a ultraestrutura de células marcadas com ^3H -timidina no bulbo olfatório, hipocampo e neocórtex de ratos adultos e confirmou que verdadeiramente eram novos neurônios (KAPLAN e HINDS, 1977; KAPLAN, 1981, 1985).

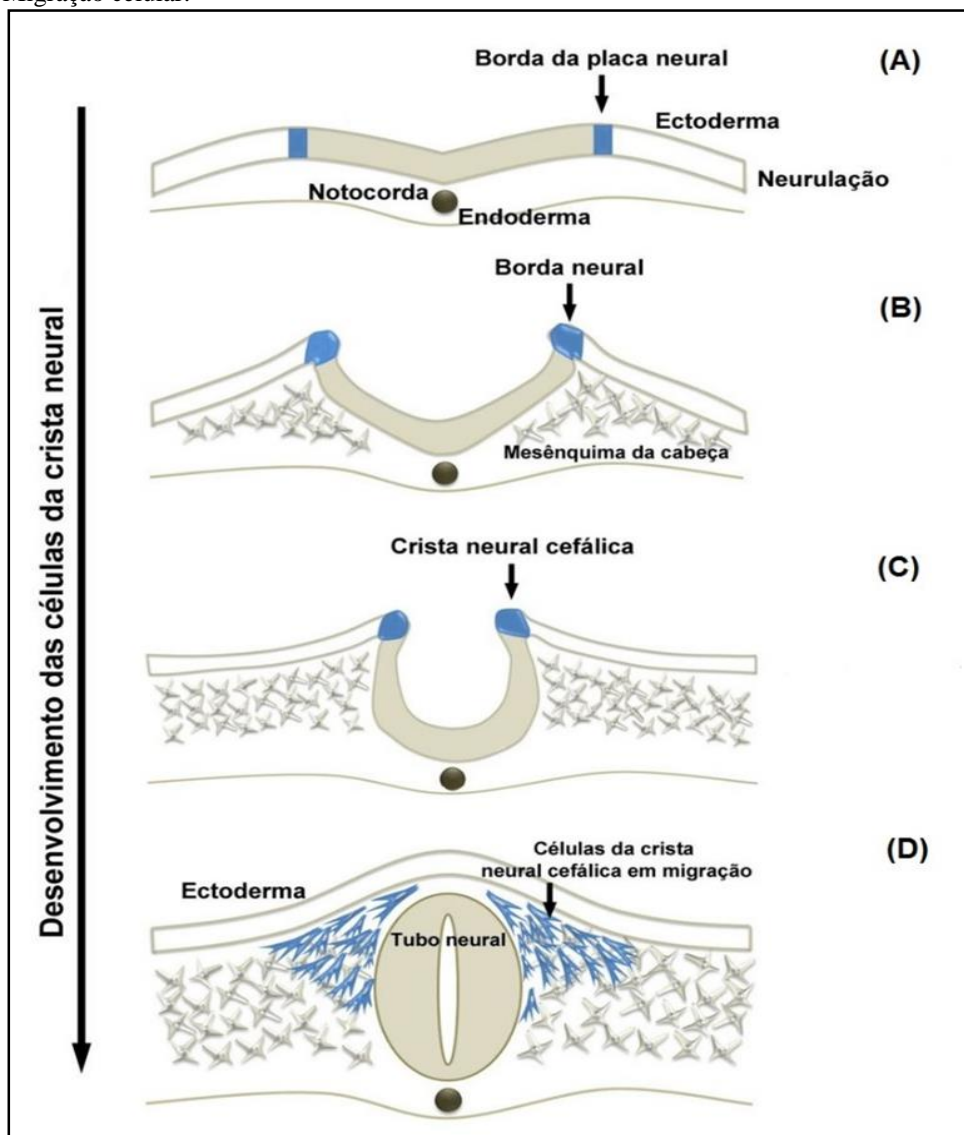
Desde então, estudos científicos têm revelado que o cérebro de um mamífero é muito mais maleável do que até então se imaginava, modificando-se sob o efeito das experiências, das percepções, das ações e dos comportamentos. Assim, o processo da plasticidade cerebral explica o fato de certas regiões do nosso cérebro possuir a capacidade de substituir as funções afetadas através de complexos mecanismos de reorganização cerebral.

1.2 ORIGEM DAS CÉLULAS ESTAMINAIS NEURAIS

Atualmente, sabe-se que a auto renovação celular e a neurogênese são processos de reorganização cerebral rigorosamente controlado e que ocorrem em diferentes etapas durante a formação do SNC (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015). As células-tronco, ou também denominadas de células estaminais, são células totipotentes capazes de originar um organismo completo que sofrem sucessivas clivagens passando pelo estágio de mórula até a formação de

uma estrutura esférica oca denominada blastocisto. Essas células, adquirem a característica de serem pluripotentes e darão origem ao embrião, seguindo assim para o estágio de gástrula (GILBERT, 2000; METZGER; SIMUNOVIC; BRIVANLOU, 2018). A gastrulação envolve uma série de movimentos celulares, divisões e invaginações que transformam a pequena massa celular nos três folhetos embrionários: a endoderme; camada mais interna responsável pela formação do trato digestivo, a mesoderme; camada intermediária que dará origem ao sistema circulatório, aos órgãos reprodutivos, aos tecidos musculares e aos rins e a ectoderme camada mais externa que originará a epiderme e o sistema nervoso (Figura 1).

Figura 1- Formação do tubo neural. (A) Após a gastrulação, o neuroepitélio se diferencia originando a ectoderme, a mesoderme e a endoderme. (B) Proliferação de células-tronco e invaginação ectoderme. (C) Formação das pregas neurais em forma de “U”. (D) Migração celular.

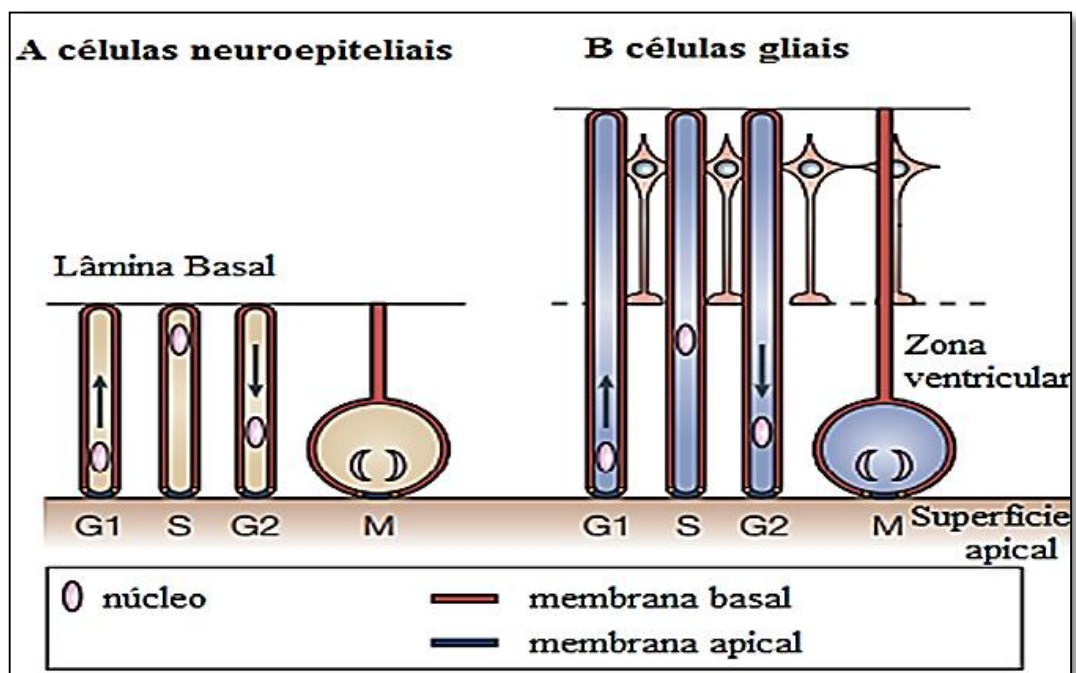


Fonte: Adaptado de FREEMAN e BRACEGIRDLE 1982.

A neurulação; ou seja, o processo de formação do tubo neural inicia-se com a proliferação das células multipotentes que rodeiam a placa neural e com a invaginação da ectoderme para formar uma estrutura tubular (Figura 1). Após a formação da placa neural, os seus bordos ficam mais finos e ascendem para formar as pregas neurais, enquanto o sulco neural, em forma de “U”, surge no centro da placa, dividindo os futuros lados esquerdo e direito do cérebro do embrião. As pregas neurais migram em direção à linha média da estrutura cerebral pré-formada, fundindo-se para originar o tubo neural (SMITH e SCHOENWOLF, 1997; METZGER; SIMUNOVIC; BRIVANLOU, 2018). Finalmente, o tubo neural é a estrutura embrionária que dará origem ao cérebro propriamente dito.

A próxima etapa da neurogênese envolve a estimulação subsequente das células presentes na crista neural; processo conhecido como proliferação celular. A proliferação, induz os núcleos celulares a moverem-se a medida que a célula se divide (GÖTZ e HUTTNER, 2005) e assim a se diferenciarem dando origem a neurônios (Figura 2A) e as células glias na sequência (Figura 2B).

Figura 2- Migração de células neuroepiteliais e células glias. A imagem retrata a polarização celular e a organização do núcleo de células neuroepiteliais e células glias durante a proliferação, diferenciação e migração. (A) As células neuroepiteliais migram da base durante a fase G1 do ciclo celular, atingem o ápice durante a fase S e retornam para a base durante a fase G2 da mitose. (B) Células glias ficam confinadas a porção entre a base e ápice nas zonas subventriculares e ventriculares.



Fonte: adaptado de GÖTZ e HUTTNER, 2005.

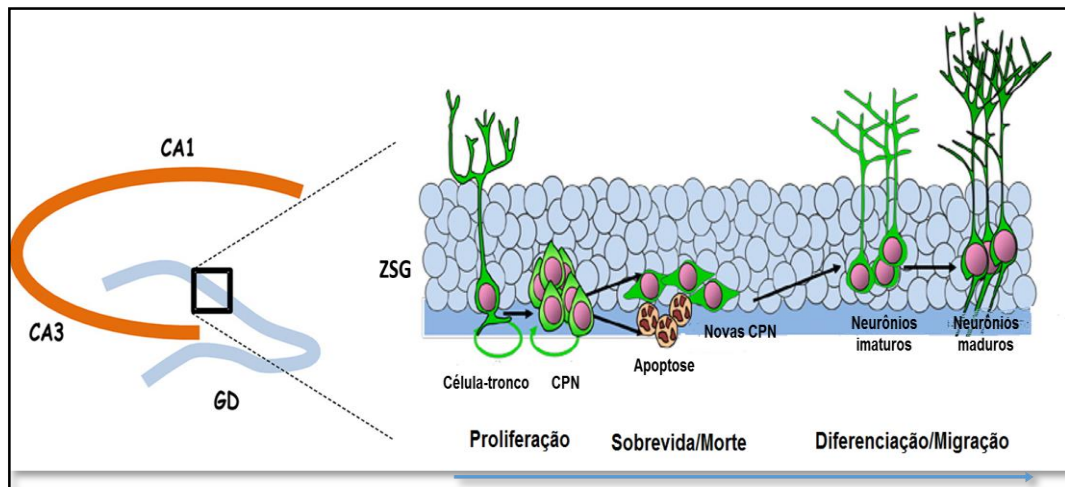
A transição das células neuroepiteliais para as gliais radiais durante o desenvolvimento embrionário representa a diferenciação celular e está intimamente associado com o ciclo celular. Desta forma, quando existe alguma alteração durante o desenvolvimento embrionário e/ou a formação do tubo neural, o ciclo celular se prolonga (DEHAY e KENNEDY, 2007).

O ciclo celular corresponde a uma sequência de eventos, que ocorre durante o tempo de vida de uma célula eucariótica com o intuito de promover a proliferação celular e é dividido em fases distintas: mitose (M) e divisão celular que ocorrem durante a fase M relativamente breve, que é seguida pela fase G1 (do inglês *gap*). Esse é o principal período de crescimento (proliferação) celular, síntese de enzimas e proteínas e abrange a parte mais longa do ciclo celular. A fase G1 dá lugar à fase S que representa a síntese celular, período do ciclo celular, quando o material genético (DNA) é duplicado. Após a fase S, na fase G2 a célula se prepara para dividir, seguida pela entrada na fase M retomando um novo ciclo (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Entretanto, além da alteração na duração do ciclo celular, algumas situações levam a divisão celular descontrolada. Especificamente, uma redução na precisão do posicionamento do fuso em relação ao eixo apical-basal das células neuroepiteliais pode ser suficiente para resultar, em clivagens diferentes do padrão simétrico. Esses movimentos intercinéticos e divisões simétricas caracterizam as fases iniciais da expansão do SNC, aumentando o número de células e o tamanho do neuroepitélio (FAIGLE e SONG, 2013).

A evolução da neurogênese se inicia pela mudança da proliferação para a diferenciação celular, etapa em que as células pluripotentes geram células mais diferenciadas denominadas de CPN, as quais são responsáveis pela geração das estruturas cerebrais e dos diferentes tipos de neurônios e células gliais do sistema nervoso (Figura 3).

Figura 3- Representação esquemática da neurogênese hipocampal. Novos neurônios que integram a camada de células granulares do giro denteado do hipocampo (GD) originário de células-tronco CPN localizadas na zona subgranular (ZSG). No curso de sua maturação, elas exibem propriedades específicas que os conferem à função comportamental única.



Fonte: adaptado de KOEHL, 2015.

O desenvolvimento do SNC é o resultado de eventos controlados que se iniciam com a proliferação e especificação da identidade da célula neural, seguido pela migração e maturação/diferenciação celular (GÖTZ e HUTTNER, 2005). Esses eventos resultam na geração de dois tipos celulares: uma CPN indiferenciada, que permanece na zona subventricular (ZSV), região situada nas paredes dos ventrículos laterais, onde as novas células migram para o bulbo olfatório através do fluxo migratório rostral, e células multipotentes, que migram da zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) do hipocampo, para se diferenciar nas diferentes linhagens neurais (neurônios, astrócitos, oligodendrocitos, células gliais) (Figura 3). Muitas destas novas células morrem pouco depois de proliferarem, enquanto outras se integram funcionalmente no tecido cerebral.

1.3 PROLIFERAÇÃO E MATURAÇÃO DE CPNs

Estudos relatando a neurogênese no SNC permitiram afirmar que milhares de novos neurônios são formados todos os dias no encéfalo adulto, principalmente na região do GD do hipocampo.

Kempermann e colaboradores (1997) propuseram que os novos neurônios do GD atuam como “comportas” na “entrada de informações” para a memória. Segundo os autores, a neurogênese hipocampal adulta estaria envolvida no processamento de informações mantidas transitoriamente. As células do hipocampo recém geradas parecem exercer função na cognição e na reparação de danos cerebrais (ANACKER e HEN, 2017).

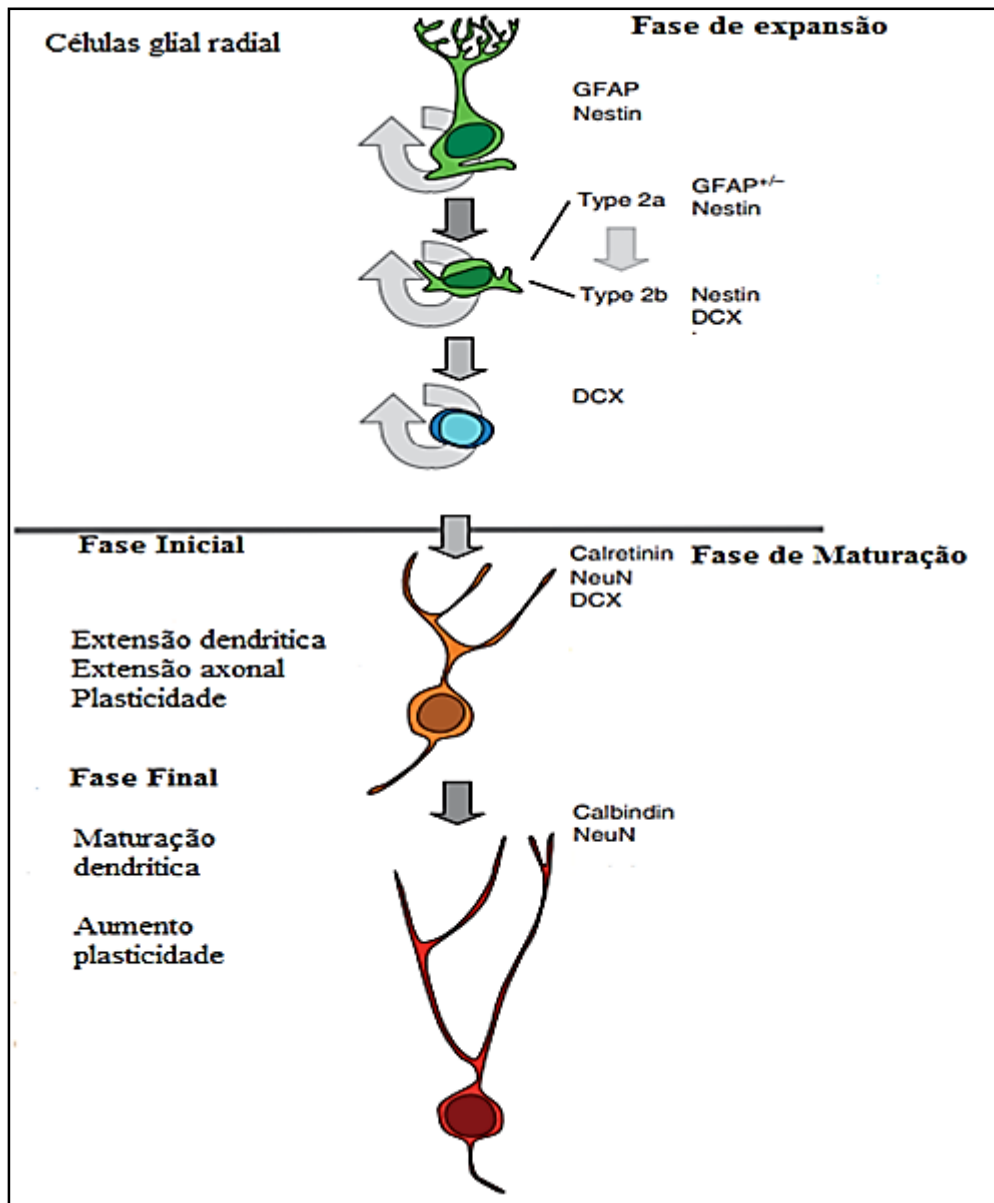
Em mamíferos adultos, as CPNs encontram-se na ZSG do GD, região localizada entre o hilo e a camada granular do hipocampo (Figura 3, esquerda). As CPNs migram para a camada granular onde passam pelo processo de maturação dando origem as células granulares propriamente ditas com sinapses funcionais conforme demonstrado na Figura 3 (KOEHL, 2015).

O primeiro precursor celular evidenciado foi descrito como uma célula glial radial (SERI et al., 2001), atualmente conhecido como progenitor quiescente (PNQs). Os PNQs expressam a proteína glial fibrilar ácida (GFAP- do inglês *glial fibrillary acidic protein*) e nestina (DUAN et al., 2008; LINDSEY et al., 2018) e possuem baixa divisão celular. Quando se dividem, originam células do tipo II ou C que expressam nestina e não mais GFAP (Figura 4). Mantem sua divisão expressando marcadores de neurônios imaturos e neuritos (futuros axônios e dendritos), sendo nessa etapa denominado neuroblastos.

As células do tipo II transitam no GD do hipocampo, e são caracterizadas pela expressão de: doublecortina (DCX), uma proteína associada de microtúbulos; proteína ligante do cálcio (Calretinina) e da proteína nuclear neuronal (NeuN) (KEMPERMANN, 2010).

No giro denteado, os neurônios novos migram (processo altamente regulado) para dentro da camada de células granulares e elaboram a produção do axônio e dos dendritos para a região CA3 (*Cornu ammonis 3*) do hipocampo onde os neurônios recém-formados exibem alta plasticidade sináptica; ou seja, capacidade de exercer suas funções eletrofisiológicas (Figura 4).

Figura 4- Estágios de diferenciação no curso da neurogênese hipocampal. GFAP (marcador de diferenciação glial); DCX (marcador de célula indiferenciada); NeuN (marcador de neurônios).



Fonte: adaptado de KEMPERMANN et al. (2015).

Desta forma, para avaliar a diferenciação neural *in vitro* e/ou *in vivo*, marcadores específicos de CPNs, bem como de neurônios e glias recém-sintetizados se fazem disponíveis. As proteínas que compõem o citoesqueleto das células são expressas em padrões específicos do tipo celular, permitindo o acompanhamento da diferenciação e desenvolvimento neural dentre as quais se destacam: nestina, β 3-tubulina, proteínas associadas ao microtúbulos (MAP2) e GFAP (LINDSEY et al., 2018).

A nestina é um filamento intermediário do tipo VI, apesar de ser expressa em outros tipos celulares, durante o desenvolvimento neural essa proteína é expressa apenas por CPNs (células-tronco neuroepiteliais, glial radial e progenitoras neurais) (LIU et al., 2018). Por outro lado, a β 3-tubulina é um subtipo de tubulina, expressa especificamente em neurônios durante o desenvolvimento neural, inclusive em neurônios imaturos. Contudo, a MAP2 compõe a família das proteínas associadas ao microtúbulos (MAP), expressa em neurônios e atua estabilizando o crescimento dos microtúbulos (MAXI et al., 2017). Por fim, o GFAP é uma proteína expressa em células gliais (HOL e PEKONY, 2015).

Apesar dos caminhos moleculares específicos que governam esta diferenciação de CPNs *in vivo* ainda serem pouco compreendidos, é amplamente aceito que modelos *in vitro* recapitem os passos que ocorrem durante o desenvolvimento do cérebro e, assim, permitem estudar os efeitos de fatores intra e extracelulares como, por exemplo, a influência de neurotransmissores e seus receptores no controle da diferenciação neuronal.

1.4 NEUROESFERAS COMO MODELO DE NEUROGÊNESE

A utilização de neuroesferas como modelo da diferenciação neural, assim como utilizado nesta tese, abrange grande parte dos processos que envolvem a neurogênese e o desenvolvimento do SNC. Atualmente, vários métodos experimentais com pequenas variações permitem estabelecer e expandir neuroesferas em culturas. As neuroesferas são células-tronco neurais obtidas de uma suspensão de células estaminais e CPN geralmente isoladas da ZSV do telencéfalo de embriões de camundongos no 13º dia de gestação (E-13) (fase de maior proliferação celular) ou da ZSG do hipocampo de adultos.

As CPNs são plaquedas em meio suplementado com fibroblastos (B27), fatores de crescimento fibrilar (FGF2) e epidermal (EGF) e na presença desses fatores crescem em monocamadas ou agregados chamados de neuroesferas. Cada neuroesfera é derivada de uma única célula que, através de divisões assimétricas, dará origem a outra célula filha idêntica e a um progenitor mais comprometido, os quais ao se aderirem em uma superfície se diferenciam em neurônios ou células gliais espontaneamente, sendo assim a vantagem deste modelo (TRUJILLO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Além de fornecer um importante ensaio experimental, este modelo mantém as características genéticas, temporais ou espaciais do hospedeiro. Estudos comparativos do cérebro fetal e culturas de neuroesferas mostraram que a neuroesfera e as CPNs correlacionam-se em vários aspectos como a capacidade proliferativa, a diferenciação celular e potencial o químico e molecular após exposições a diferentes fatores de uma maneira que reflete o estágio

de desenvolvimento do doador. Nesse contexto, induzir o hospedeiro durante a gestação a uma determinada infecção ou inflamação e verificar as alterações provocadas durante o desenvolvimento do SNC de um embrião mimetiza uma importante estratégia experimental que contribuirá para o entendimento e melhor manejo dessas situações (JENSEN e PARMAR, 2006).

1.5 FATORES QUE AFETAM A NEUROGÊNESE

O processo da neurogênese resumidamente envolve a expansão (proliferação), diferenciação (neurogenêse *vs* gliogênese) e sobrevivência de CPNs. Esse processo é dinamicamente controlado por fatores intrínsecos (tais como EFG, FGF) e também fatores extrínsecos como o estresse, o exercício físico, a longevidade e as infecções. Um importante regulador negativo da neurogênese é a inflamação induzida por processos patológicos (DAS e BASU, 2008). Durante um processo inflamatório ocasionado por um patógeno extracelular, os estágios convencionais da neurogênese podem resultar em um diferente destino neural e interagir com fatores intrínsecos e extrínsecos de modo a estimular ou inibir a neurogênese (BOSKA, 2010).

Dentre os inúmeros fatores intrínsecos, os neurotransmissores e neuromoduladores possuem extrema relevância no controle da informação neuronal (LIN et al., 2007; NEARY e ZIMMERMANN, 2009; ZIMMERMANN, 2011). Quando se trata de neurotransmissores, esses são substâncias químicas sintetizados e liberados pelos neurônios cuja função é exercer a biossinalização na célula pós-sináptica, pela ligação com seu respectivo receptor. Em adição, o efeito deste neurotransmissor deve ser bloqueado ou mimetizado por antagonistas ou agonistas em um modo dose dependente. Finalmente, devem existir mecanismos apropriados para eliminar a ação do neurotransmissor. Tais mecanismos podem incluir degradação enzimática ou recaptção da molécula pelos neurônios pós-sinápticos ou glias por transportadores específicos (DEUTCH, 2013, p.117-138).

Atualmente, existem inúmeras moléculas que possuem papel de neurotransmissores, destacam-se os aminoácidos, as purinas e aminas, os peptídeos. Dentre as purinas de relevância, destacam-se o ATP (adenosina 5'-trifosfato) e outros nucleotídeos relacionados como o ADP (adenosina 5'-difosfato) o AMP (adenosina 5'-monofosfato), a adenosina (ADO) e a inosina (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; ZIMMERMANN, 2011). As aminas compreendem a acetilcolina, dopamina, adrenalina, histamina entre outras (BRUEL-JUNGERMAN, LUCASSEN, FRANCIS, 2011). Aliado a esses neurotransmissores, a existência de receptores ionotrópicos e metabotrópicos, bem como de transportadores de membrana ou enzimas

complementam todo o sistema de neurotransmissão (BURNSTOCK, 2007; 2009). Considerando esta diversidade de neurotransmissores, seus receptores, e conseqüentemente a um vasto número de vias de sinalização, se dará ênfase nos sistemas de neurotransmissão tradicionalmente estudados pelo nosso grupo e investigados nesta tese.

1.6 SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico exerce múltiplos papéis no desenvolvimento, remodelação plástica e regeneração do SNC (ABBRACCHIO et al., 2009). A sinalização purinérgica é uma rota comum de comunicação célula-célula envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação, proliferação e morte celular (BURNSTOCK 2004; 2008; 2009).

O ATP, molécula sinalizadora do sistema purinérgico, é um nucleotídeo trifosfatado existente em todas as células e está envolvido na regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular. Este nucleotídeo é armazenado em vesículas nas terminações sinápticas e, após despolarização neuronal, é liberado atuando em receptores específicos na membrana pós-sináptica, denominados purinoreceptores (BURNSTOCK, 2007). Albert Szent-György (1920) foi o primeiro cientista a investigar o papel do ATP como molécula energética, relevando a interação do ATP com a proteína actina e a miosina durante o processo de contração muscular. Décadas depois, Pamela Holton (1959) comprovou pela primeira vez a liberação de ATP pelos nervos terminais.

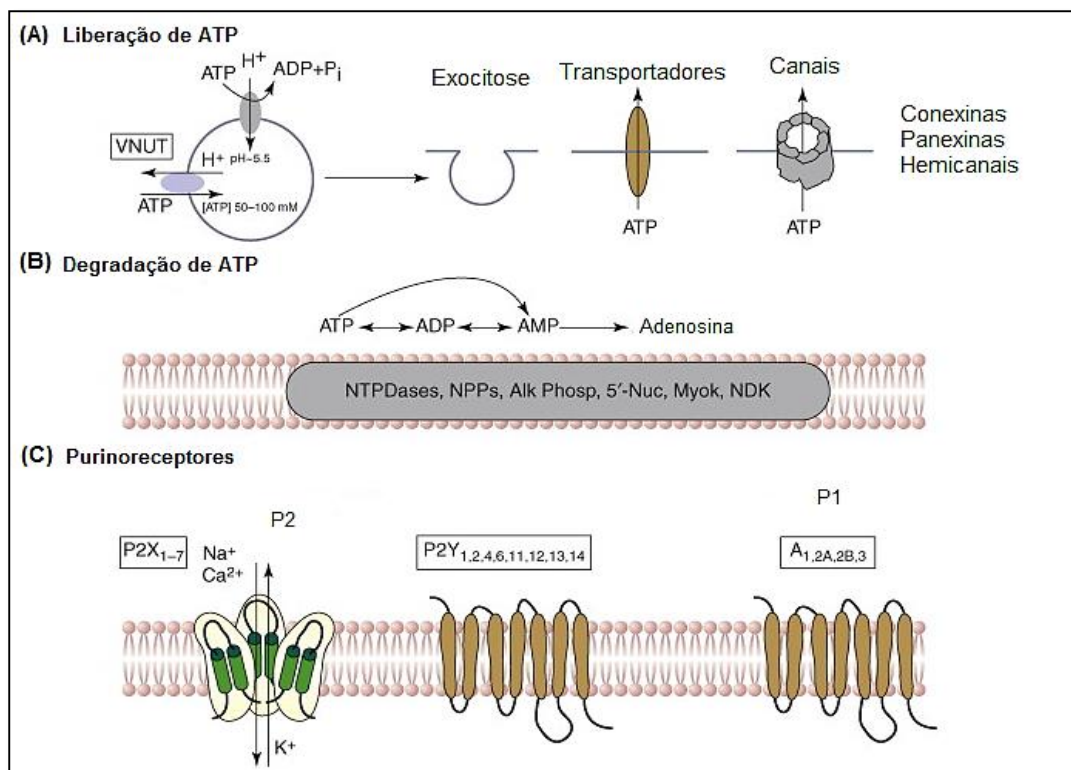
Anos mais tarde, Geoff Burnstock (1976) apresentou pela primeira vez, a hipótese de que o sistema purinérgico poderia estar relacionado com o processo de neurotransmissão, o que formalizou o conceito do ATP como uma molécula envolvida na sinalização extracelular. O ATP pode atuar tanto como transmissor quanto como co-transmissor, agindo através de purinoreceptores divididos em duas famílias distintas P2X e P2Y (Burnstock 2004; 2007; 2009).

1.6.1 Armazenamento, liberação e hidrólise extracelular de ATP e nucleotídeos relacionados

O ATP e outros nucleotídeos são absorvidos e armazenados em vesículas secretoras e sinápticas. Como demonstrado na Figura 5, o acúmulo de ATP nas vesículas é mediado por transportadores de nucleotídeos vesiculares (VNUT), que pertencem à família transportadora de ânions SLC17, que também inclui transportadores de glutamato vesicular (SAWADA et al.,

2008). O VNUT reconhece preferencialmente os nucleotídeos ATP e ADP e é inibido por diATP. Este transportador é altamente expresso no cérebro, especialmente em astrócitos. Evidências de mecanismos adicionais de liberação de nucleotídeos fosfatados, incluem transporte por excitose, transportadores de ligação ao ATP, hemicanais de conexina ou panexina, canais aniônicos dependentes de voltagem (Figura 5A) e purinoreceptores (Figura 5C).

Figura 5- Mecanismos de liberação, degradação e recaptção do ATP. Abreviaturas: Alk Phos, fosfatase alcalina; Myok, myokinase (adenilato cinase); NDK, nucleosídeo difosfato quinase; E-NPPs, pirofosfatase de nucleotídeos e / ou fosfodiesterases; 5'-NT, 5'-nucleotidase; VNUT, transportador nucleotídico vesicular.



Fonte: adaptado de ABBRACCHIO et al. (2009).

Após a liberação, o ATP e outros nucleotídeos sofrem rápida degradação enzimática pelas ectonucleotidasas, que são enzimas que controlam o tempo de vida dos nucleotídeos e também produzem ligantes para os purinoreceptores (Figura 5B) (ZIMMERMANN, 2006). Todas as famílias de ectonucleotidase identificadas até o presente momento são expressas no cérebro; entre essas incluem as E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase e/ou fosfodiesterases), fosfatases alcalinas e ecto-5'-nucleotidasas (ecto-5'-NT) (ZIMMERMANN, 1996; 2006; ROBSON; SÉVIGNY;

ZIMMERMANN, 2006). Essas enzimas diferem quanto a especificidade do substrato e a formação do produto.

As E-NTPDases e as E-NPPs hidrolisam o ATP e o ADP a AMP, que é ainda hidrolisado em adenosina pela ecto-5'-NT (Figura 5B). As fosfatases alcalinas, por sua vez hidrolisam nucleotídeos tri, di e monofosfatados. Além das ectonucleotidases tradicionais, existem enzimas responsáveis pela síntese de ATP extracelular (por exemplo, ectonucleosídeo-difosfato-quinase e adenilato-cinase) como também as enzimas responsáveis pela interconversão de nucleotídeos e refosforilação de nucleotídeos (ZIMMERMANN, 2006).

1.6.2 Receptores purinérgicos

Os purinoreceptores para ligação do ATP (receptores P2R), também denominados de purinoreceptores, foram reconhecidos após a identificação dos receptores para o nucleosídeo adenosina (receptores P1R). Receptores do tipo P2 são divididos em receptores P2X ionotrópico e receptores P2Y metabotrópicos com base no mecanismo de ação, farmacologia e clonagem molecular (WEBB et al., 1993; BRAKE et al., 1994; BURNSTOCK E KNIGHT, 2004) (Figura 5C). Atualmente, os purinoreceptores são os receptores mais abundantes encontrado nos tecidos de mamíferos, como, de fato, podem ser encontrados em todos os tipos de células, incluindo as de origem neural (ABBRACCHIO et al. 2009; BURNSTOCK, 2016).

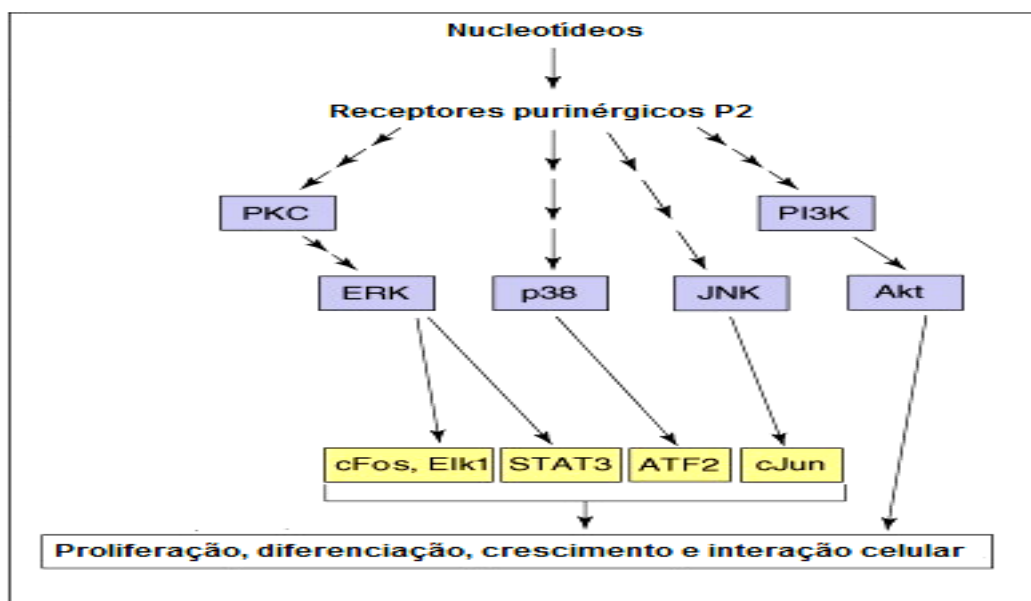
O nucleosídeo adenosina (ADO) possui afinidade por receptores do tipo P1. Os quatro receptores de ADO A1, A_{2A}, A_{2B} e A3 são acoplados à proteína G (Figura 5) (LATEK et al., 2012). Tipicamente, A1 e A3 acoplam à família Gi/o responsáveis pela inibição da produção do segundo mensageiro o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), enquanto que A_{2A} e A_{2B} estimulam a produção de AMPc através de proteínas Gs (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; FREDHOLM et al., 2005). Assim, no SNC, a adenosina exerce uma infinidade de funções, incluindo a modulação das funções neurais e gliais, a sinalização neurogênica e o desenvolvimento neural (DUNWIDDIE e MASINO, 2001; LATIN e PEDATA, 2001).

A família P2X, consiste de receptores ionotrópicos ligados a canais iônicos que quando ativados resultam na abertura de um poro na membrana celular que permite a passagem de cátions Na⁺, K⁺ e Ca⁺². Essa família, está dividida em sete membros (P2X 1-7), os quais estão distribuídos em neurônios, células gliais e no músculo liso (KHAKH e NORTH, 2006). Os receptores heteroméricos P2X_{1/5} foram identificados em astrócitos corticais (LALO et al., 2008), enquanto subunidades P2X₁ e P2X₅ são expressas em células de Schwann (TODD e ROBITAILLE, 2006) e receptores P2X₄ em micróglia (TSUDA et al., 2003). Todas as subunidades P2X₇ são expressas em células neurais, entretanto esta expressão é heterogênea

em diferentes regiões do cérebro e em diferentes concentrações de ATP (SPERLÁGH et al., 2006). Além disso, o receptor P2X7 fornece a via mais importante para o influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico. Quando há estimulação de receptores P2X7, o Ca^{2+} desencadeia sinais citosólicos em muitos neurônios do SNC, regulando a liberação de neurotransmissores (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

A família P2Y, por sua vez, consiste em receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e foram funcionalmente descritos oito membros (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), que apresentam uma ampla distribuição nos tecidos e sistemas, tais como vascular, nervoso e cardíaco (BURNSTOCK, 2007; ZIMMERMANN, 2011). Os receptores do tipo P2Y e P2X ativam proteínas (Gq), a qual ativa fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) /Akt através de uma sinalização em cascata que ativa as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK). As MAPKs, por sua vez, são ativadas em sequência e compreendem uma família maior de proteínas que consiste em proteínas quinases sinalizadas e ativadas por estresse (ERKs) como as c-Jun N terminais quinases (JNKs) e p38/MAPKs (DIVIRGILIO et al., 2001; MAJUMDER et al., 2007) (Figura 6).

Figura 6- Diagrama esquemático da sinalização de receptores P2. A ligação do ATP nos receptores purinérgicos tipo P2 inicia a cascata de sinalização das proteínas quinases incluindo membros da família MAPK (ERK, p38 e JNK) e Akt. A estimulação de proteínas quinases leva à indução ou ativação de fatores de transcrição a proliferação, a diferenciação, o crescimento, a migração e as interações célula-célula. Abreviaturas: ERK, (proteína quinase regulada por sinal extracelular); PI3K, (fosfoinositol- 3-quinase); PKC (proteína quinase C); JNK (quinase N-terminal c-Jun); STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição).



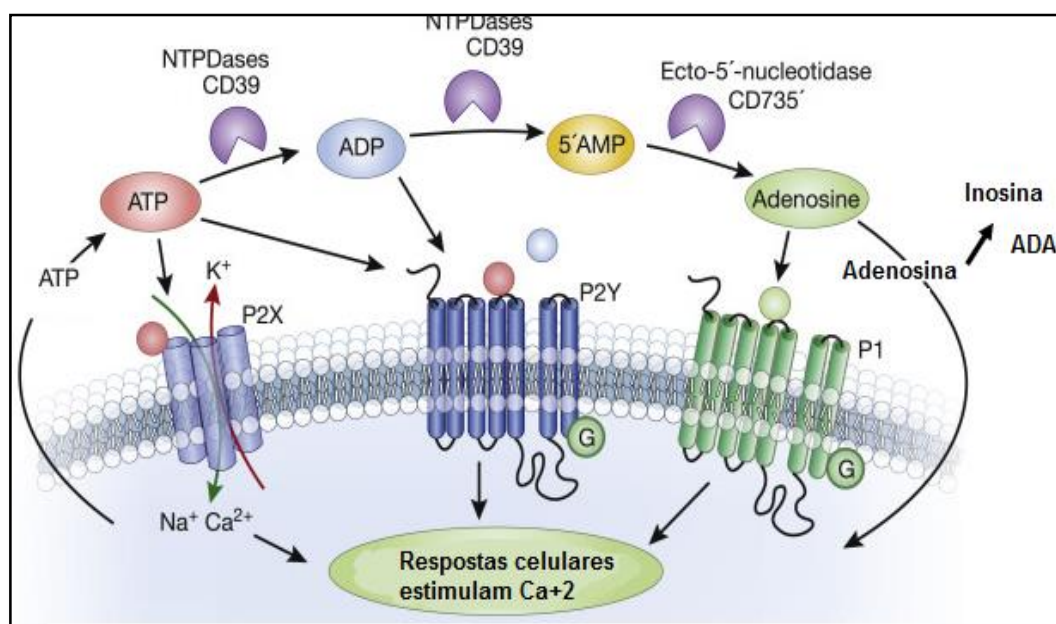
Fonte: adaptado de: NEARY e ZIMMERMANN (2009).

Além disso, os receptores do tipo P2Y quando ativados, acoplam a proteína Gi/o, que inibe a adenilil ciclase e modula canais iônicos (ABBRACCHIO et al., 2006; BURNSTOCK e VERKHRATSKY, 2009). O acoplamento do mesmo receptor P2Y a diferentes proteínas do tipo G, indicam uma sinalização específica do agonista que pode guiar diferencialmente a resposta neuronal ou glial sob condições nas quais diferentes tipos de nucleotídeos são liberados.

1.6.3 Ectonucleotidases

Além dos receptores purinérgicos, os níveis desses nucleotídeos extracelulares são regulados por uma cascata de hidrólise constituída por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular, chamadas de ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 1996; 2006; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). As ectonucleotidases podem estar ou não ancoradas na membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular, ou estão presentes na forma solúvel no meio intersticial (ZIMMERMANN, 2011). Este grupo de enzimas é constituído pelas famílias das E-NPP, NTPDases, ecto-5'-NT e fosfatases alcalinas. Estas enzimas são capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP e AMP aos seus receptores específicos (ZIMMERMANN, 1996; 2011). Na presente tese, dar-se-á maior ênfase a família das NTPDases e ecto-5'-NT, objetos deste estudo.

Figura 7 – Cascata de enzimas purinérgicas e receptores. Ectonucleotidases localizadas na membrana plasmática catalisam a hidrólise sequencial de ATP para ADP, AMP e ADO. Os receptores P1 reconhecem a adenosina, enquanto os receptores P2 se ligam a moléculas nucleotídicas di e trifosfato.



Fonte: adaptado de MENZIES et al. (2017).

Os membros da família das NTPDases são codificados por oito genes diferentes. Quatro membros desta família de enzimas estão localizados na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular, sendo eles NTPDases 1, 2, 3 e 8 (ZIMMERMANN, 2011). A NTPDase 1 hidrolisa ATP e ADP igualmente, enquanto a NTPDase 3 e a NTPDase 8 apresentam preferência por ATP em relação ao ADP como substrato. A NTPDase 2, caracteriza-se por possuir uma alta preferência por nucleosídeos trifosfatados e foi previamente classificada como uma ecto-ATPase (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Outros dois membros conhecidos como NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular, porém, são secretadas após expressão heteróloga (BRAUN et al., 2000). As NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com o sítio ativo voltado para o citoplasma celular (BIEDERBICK et al., 2000). Estas enzimas hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). A ecto-5'-NT desfosforila nucleosídeos monofosfatados não cíclicos, através da hidrólise da ligação fosfodiéster de 5'-ribonucleotídeos, levando à formação do correspondente ribonucleosídeo e fosfato (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). A principal função em animais é a hidrólise do AMP até ADO. As ecto-5'-nucleotidasas apresentam uma ampla distribuição tecidual e fazem parte da cascata enzimática para finalizar a ação de nucleotídeos que agem em receptores P2X e P2Y, sendo a principal enzima responsável pela produção de ADO extracelular (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ZIMMERMANN, 2011).

Desta forma, as ectonucleotidasas controlam a disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e ADO) para ambos os receptores de nucleotídeos e nucleosídeos e, conseqüentemente, a extensão e a duração da ativação do receptor. Portanto, essa é uma via enzimática com função dupla de remoção de uma molécula sinalizadora, o ATP, e geração de uma segunda molécula, a ADO em condições não fisiológicas (Figura 7) (SCHETINGER et al., 2007).

1.6.4 Adenosina desaminase

A adenosina desaminase (ADA) (EC 3.5.4.4) também é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas, promovendo a desaminação hidrolítica da ADO e da deoxiadenosina até inosina e deoxiinosina, respectivamente (Figura 7) (CUNHA, 2001; FREDHOLM et al., 2005). Ela se apresenta como uma enzima citosólica, diferentemente das demais ectoenzimas.

A ADO possui papel neuromodulador homeostático controlando uma série de eventos intracelulares como, por exemplo, diminuir a liberação de aminoácidos excitatórios, hiperpolariza a membrana neuronal e limita o influxo de Ca^{+2} (CUNHA, 2001). Além disso, a

ADO exerce efeitos neuroprotetores em situações de estresse isquêmico, hipoxêmico e oxidativo regulando os níveis de AMP cíclico (conhecido como segundo mensageiro) intracelulares (GOMES et al., 2011).

Os receptores da adenosina são metabotrópicos e pertencentes à classe P1 de receptores purinérgicos (FREDHOLM et al., 2011), e incluem quatro tipos de receptores de adenosina: A1, A_{2A}, A_{2B} e A3, sendo que os receptores A1 e A_{2A} apresentam maior densidade no cérebro e possuem alta afinidade para adenosina enquanto o A_{2B} e A3 demonstram afinidade relativamente baixa para receptores de ADO. Esses receptores têm sido tradicionalmente classificados com base em seu acoplamento diferencial à adenil ciclase em regular os níveis de AMPc. Receptores A1 e A3 são acoplados à proteína Gi/Go e inibem a atividade da adenil ciclase, enquanto os receptores A_{2A} e A_{2B} são receptores acoplados à proteína Gs e aumentam a atividade enzimática da adenil ciclase (BALDWIN, 1994).

Portanto, a ativação dos receptores A_{2A} e A_{2B} aumenta a produção de AMPc, resultando na ativação da proteína quinase A (PKA) e na fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB). Em contraste, a ativação de A1 e A3 inibe a produção de AMPc e diminui a atividade de PKA e fosforilação da CREB (SHETH et al., 2014).

No SNC, os receptores A1 de ADO são amplamente distribuídos nos neurônios do córtex, hipocampo e cerebelo (FREDHOLM et al., 2011). Esses receptores também estão presentes em astrócitos (BIBER et al., 1997), oligodendrócitos (OTHMAN et al., 2003) e microglia (GEBICKE-HAERTER et al., 1996). Nos neurônios, os receptores A1 são altamente localizados nas regiões sinápticas, onde modulam a liberação de neurotransmissores, como glutamato, acetilcolina, serotonina e GABA. Entretanto, os receptores A_{2A} tem uma localização mais restrita as regiões do estriado e bulbo olfatório. Esses receptores estão presentes nos neurônios, microglia e oligodendrócitos e possivelmente astrócitos (FREDHOLM et al., 2011).

A ligação da ADO aos receptor A1 localizados nos neurônios pré e pós-sináptico inibe a transmissão excitatória, através do bloqueio dos canais de cálcio (FREDHOLM et al., 2005). Contudo a ligação da ADO aos receptores A_{2A} estão envolvidos na imureatividade dos processos inflamatórios.

A ADO possui, uma função importante no sistema imune atuando como um sensor de dano tecidual e estresse juntamente com o ATP em processos inflamatórios (HASKÓ et al., 2000). A adenosina exerce seus efeitos protetores por (a) diminuir a demanda de energia; (b) aumentar a disponibilidade de nutrientes através da vasodilatação (c) estimular a função efetora das células T (DI VIRGILIO e VUERICH, 2015; KASHFI et al., 2017).

Embora a resposta imune e a ADO desempenharem um papel essencial na preservação do tecido, a ligação da ADO aos receptores representa uma via imunossupressora endógena potente que regula a resposta imunitária exuberante a insultos externos.

1.7 A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA NEUROINFLAMAÇÃO

A inflamação é a reação do corpo mais fundamental a estímulos nocivos. Vários mediadores da inflamação, exógenos ou endógenos são conhecidos (BARTON, 2008). Entre os fatores endógenos, os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares estão atraindo interesse por sua onipresença e notável capacidade de modular diversas respostas imunológicas. Além disso, enzimas que degradam nucleotídeos/nucleosídeos extracelulares, como ectoATP/ADPases (CD39), ectoAMPase (CD73) e ADA, também possuem atividade imunomoduladora (DI VIRGILIO e VUERICH, 2015).

O envolvimento do ATP extracelular (ATPe) na inflamação sistêmica datam da década de 1970, quando Dahlquist e Diamant (1970) relataram sua ação na liberação de histamina por mastócitos em ratos. Mais tarde, Cockcroft e Gomperts (1980) postularam a expressão de um receptor específico de ligação ao ATP em mastócitos, que foi identificado como o receptor P2X7. Essas primeiras observações foram seguidas por relatos dispersos da capacidade desse nucleotídeo em participar na inflamação. De modo geral, o receptor P2X7 tem o papel mais claro na inflamação; e isso deve-se ao fato de que o ligante do P2X7; ou seja o ATP é um potente bloqueador na liberação de interleucina 1 beta (IL-1 β) (FERRARI et al., 1996). O receptor P2Y2, por sua vez, parece ter um papel crucial na orientação dos neutrófilos em um gradiente quimiotático (CHEN et al., 2006). Em contraste, o P2Y11 desempenha um papel importante na interface entre imunidade inata e adaptativa, induzindo a maturação de células dendríticas (CDs) (LA SALA et al., 2003).

No entanto, o conceito de que a sinalização purinérgica é crucial na neuroinflamação é bastante recente e continua evoluindo não sendo ainda um conceito fechado. O SNC hospeda células imunes residentes (micróglia e astrócitos) que reagem a patógenos ou danos, migram para o local da lesão, fagocitam microrganismos invasores ou restos celulares, elaboram e secretam citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (UWE-KARSTEN et al., 2002). Nesse sentido, a micróglia expressa subtipos de receptores de ADO e receptores P2 modulado por nucleotídeos/nucleosídeos extracelulares em respostas como proliferação, migração, fagocitose, liberação de citocinas e quimiocinas, tornando este tipo de célula um paradigma para estudos purinérgicos em inflamação (POCOCK e KETTENMANN, 2007).

Xiang e Burnstock (2005) caracterizaram a expressão de receptores P2X em micróglia por imunofluorescência e reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR). Eles demonstraram uma expressão abundante de receptores P2X1 e P2X4 em micróglia, enquanto P2X7 foi expresso apenas em uma subpopulação.

Curiosamente, as células da micróglia expressam CD39 e CD73, isoformas de ectonucleotidases (SCHOEN; GRAEBER; KREUTZBERG, 1992; BRAUN et al., 2000). Enquanto a atividade de CD39 gera AMP a partir de ATP, CD73 gera ADO a partir de AMP. Receptores para ADO na microglia foram descritos por Gebicke-Harter e colaboradores (1996). A estimulação da micróglia com o agonista do receptor A1 e A2 aumenta a proliferação da micróglia, já os receptores A3, que foram identificados em células microgliais de ratos, desencadeiam uma resposta dependente de ERK1/2 (HAMMARBERG; SCHULTE; FREDHOLM, 2003).

As células microgliais podem liberar um amplo espectro de substâncias, incluindo citocinas, e a estimulação dos receptores P2X7 pelo ATP estimulam a liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na microglia que é regulado pela cascata das proteínas ERK/p38 e JNK (SUZUKI et al., 2004). A interleucina-6 (IL-6) é outra citocina, que é liberada em resposta à estimulação do receptor purinérgico P2X7. Ferrari e colaboradores (1997) demonstraram uma interação complexa entre receptores purinérgicos, liberação de ATP e sinalização IL-1 β . Durante um processo patológico, o ATP é liberado pelas células microgliais, regulando a síntese e liberação de IL-1 β pela ativação de receptores purinérgicos. Seo et al. (2004) demonstraram que o ATP liberado por micróglia ativada por patógenos extracelulares induz a expressão de interleucina-10 (IL-10) mediada por receptores purinérgicos do tipo P2Y. Ogata et al. (2013) relataram que o ATP inibe a liberação de TNF- α , IL-1- β e IL-6 induzida por lipopolissacarídeo (LPS), através da redução na expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase2 (COX-2) por um mecanismo envolvido em p38/ MAPK (BRAUTIGAM et al., 2005). Os receptores P2X e P2Y também são expressos pelos astrócitos no SNC (ABBRACCHIO e CERUTI, 2006). No entanto, estes receptores são recrutados diferentemente dependendo de condições específicas.

Atualmente, reconhece-se que os astrócitos participam ativamente da neurotransmissão, e o ATP tem sido identificado como um mediador do influxo de cálcio em astrócitos e na sinalização recíproca de neurônios-glia (FIELDS e BURNSTOCK, 2006). Os astrócitos favorecem reações neuroinflamatórias, através da astrogliose; um fenômeno de longo prazo caracterizado pela proliferação celular; hipertrofia; síntese melhorada de neurotrofinas e mediadores inflamatórios.

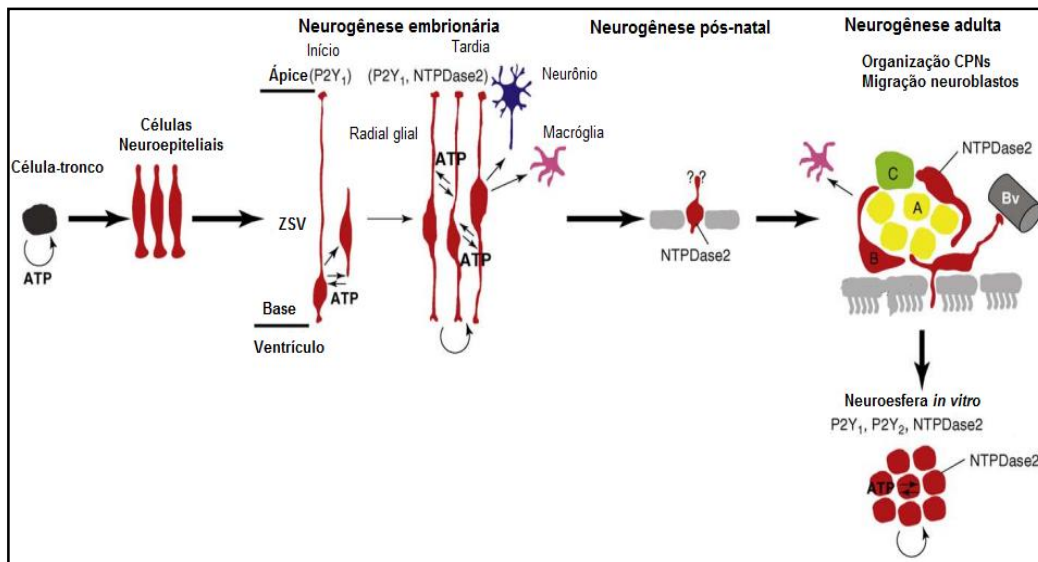
De um lado, os astrócitos reativos podem impedir a sobrevivência e regeneração neuronal sintetizando moléculas neurotóxicas, incluindo citocinas, óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico, os quais favorecem a inflamação e a injúria tecidual. Por outro lado, o efeito da neuroinflamação mediada por astrogliose também pode ser benéfico. Por exemplo, no sistema nervoso periférico, astrócitos ativados são necessários para o crescimento axonal, orientação, reparo, produção de substratos energéticos e neurotrofinas; bem como, podem atuar como radicais livres restaurando a barreira hematoencefálica (BHE) e promovendo a neovascularização (KOIZUMI et al., 2013). Embora a maioria das informações disponíveis sobre a sinalização purinérgica na neuroinflamação se refira ao papel da micróglia ou astrócitos, é provável que os nucleotídeos extracelulares também tenham um papel crucial no recrutamento e ativação de linfócitos e CDs no cérebro (NEARY e ZIMMERMANN, 2009). Os linfócitos e CDs são as células-chave da imunidade adaptativa e, como tal, participam da patogênese de várias doenças neuroinflamatórias. O efeito imunomodulador de nucleotídeos extracelulares em linfócitos e CDs mantém o microambiente imunossupressor do cérebro através da geração de ADO via CD39 (DEAGLIO et al., 2007). Baixas concentrações de ATP na periferia das células estimulam a secreção de fatores imunossupressores como a IL-10 ou até mesmo estimulam a diferenciação de células T (SWENNEN et al., 2005).

1.8 NEUROGÊNESE, NEUROINFLAMAÇÃO E NUCLEOTÍDEOS: UM CENÁRIO INTRIGANTE E COMPLEXO

Embora pouco se saiba sobre o papel dos nucleotídeos e nucleosídeos na neurogênese, o envolvimento dos receptores purinérgicos são amplamente distribuídos em todo o SNC, e são os principais responsáveis por regular o equilíbrio entre os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos e a ação das ectonucleotidases na transmissão sináptica. A maioria dos estudos relatando as ações extracelulares do ATP demonstram o envolvimento desta molécula na neurotransmissão e neuromodulação no SNC (RODRIGUES; TOMÉ; CUNHA, 2015). No entanto, as purinas e pirimidinas também podem ter papéis na proliferação celular e crescimento, bem como na citotoxicidade (BURNSTOCK, 2018).

O ATP pode atuar como um fator de crescimento neurotrófico, modulando o desenvolvimento dos neurônios e células gliais. Durante a formação do tubo neural, uma intensa proliferação celular ocorre na ZSV expressando receptores P1 e P2. Durante a diferenciação, fatores de crescimento como EGF atuam como agonistas dos receptores P2Y1 e P2Y2 estimulando a neurogênese embrionária e adulta ou a gliogênese (NEARY e ZIMMERMANN, 2009) (Figura 8).

Figura 8- Sinalização purinérgica no desenvolvimento embrionário e adulto. Após a neurulação, as células neuroepiteliais do tubo neural funcionam como células-tronco pluripotentes, dando origem a neurônios e micróglia no cérebro. Mais tarde células neuroepiteliais se transformam em glia radial cortical. Durante a neurogênese precoce, a sinalização intercelular do ATP é essencial para a migração das CPNs da ZSV. Durante a neurogênese adulta, o ATP liberado da glia radial cortical medeia as ondas de Ca^{2+} que são essenciais para originar os neurônios primeiramente e depois glia. Em regiões neurogênicas (ZSV do ventrículo e ZSG do hipocampo), as células-tronco adultas possuem potencial para gerar neurônios (e glia) durante a vida pós-natal e adulta.



Fonte: Adaptado de NEARY e ZIMMERMANN (2009).

Na presença de ATP há uma maior proliferação de células-tronco embrionárias pluripotentes. As células gliais radiais corticais derivadas das células neuroepiteliais do tubo neural migram da base da superfície ventricular ao ápice. Essas células precursoras multipotentes geram neurônios e células microgliais (GRIMM; ULLSPERGER; ZIMMERMANN, 2010). Durante a fase inicial da neurogênese, a sinalização intercelular do ATP é essencial para a migração de CPNs para a ZSV. Na neurogênese tardia, o ATP liberado da célula glia radial cortical que expressa a NTPDase2 medeia as ondas de Ca^{2+} que são essenciais para a formação do ventrículo (NEARY e ZIMMERMANN, 2009). Na neurogênese pós-natal, as CPNs persistem na SVZ adulta com o potencial para proliferar e formar neurônios e glia (UESAKA; NAGASHIMADA; ENOMOTO, 2015). Em roedores, os neuroblastos migrantes (células do tipo A) são envolvidos por tubos gliais formados por células do tipo B. Algumas das células do tipo B (referidas como células B1) estendem um processo através do endrimo para o lúmen do ventrículo lateral e, além disso, entram em contato com os vasos de sangue subjacente (NEARY e ZIMMERMANN, 2009). A NTPDase2 continua a ser um marcador de CPNs na neurogênese adulta. As neuroesferas isoladas da ZSV expressam NTPDase2 e permanecem multipotentes, as quais podem liberar ATP e expressar receptores

purinérgicos, cuja ativação estimula a proliferação celular mediada por fatores de crescimento (Figura 8) (SHUKLA et al., 2005). A adenosina, por outro lado pode estimular ou inibir a proliferação de células progenitoras. No caso da estimulação, a via é mediada pela ativação de receptores A₁ envolvendo uma cascata de sinalização através de vias metabólicas tipo ERK e Akt (MIGITA et al., 2008). Na inibição, a ativação de receptores do tipo A_{2A} estimulam a produção de AMPc intracelular, o qual protege as células da apoptose (STOCKWELL; JAKOVA; CAYABYAB, 2017).

Assim, a reação inflamatória pode ser prejudicial ou benéfica dependendo do momento, do painel de mediadores inflamatórios e dos tipos celulares envolvidos. Portanto, investigar a expressão de purinoreceptores em células neuroimunes se torna relevante. Por exemplo, a ativação de micróglia poderia elevar a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias durante um processo patológico? A neurogênese poderia ser afetada durante uma infecção? A ativação microglial durante uma infecção seria capaz de modular a função das células imunes no SNC e exerceria efeitos diretos nas CPNs? Os níveis de nucleotídeos participariam como jogadores-chave neste cenário tão complexo? Estas hipóteses sustentaram os objetivos desta tese.

Além disso, vários estudos documentam processos patológicos ao SNC, acompanhados por altas concentrações de nucleotídeos extracelulares, principalmente o ATP. O ATP é conhecido como um sinal de dano, ou padrão molecular associado ao dano (DI VIRGILIO, 2005). Uma vez liberado, o ATP contribui para o desencadeamento da resposta inflamatória juntamente com os padrões moleculares associados a patógenos (MARIATHASAN e MONACK, 2007). Conforme estudos publicados por Tonin et al. (2013; 2014), o sistema purinérgico têm uma participação efetiva em mecanismos imunomodulatórios de parasitoses como a toxoplasmose, especialmente o ATP. Em um estudo desenvolvido por Bottari et al. (2015 a,b), os autores demonstram que durante uma infecção por *T. gondii* enzimas envolvidas na regulação do ATP são alteradas pelo parasito.

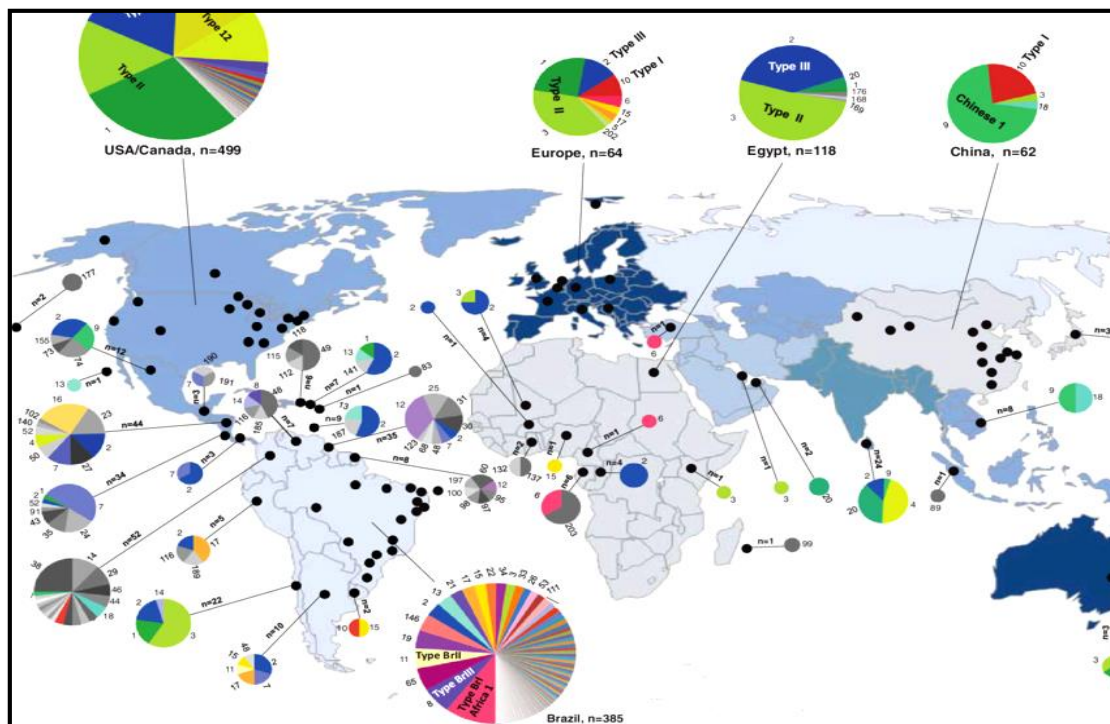
Considerando que o processamento de informação no cérebro resulta da interação contínua entre as redes neuronais, as vias de transmissão sinápticas, a difusão de nucleotídeos/nucleosídeos, íons e segundos mensageiros investigar vias de sinalização alternativas, torna-se cada vez mais relevante a fim de determinar novas vias terapêuticas para inúmeras doenças como é o caso da toxoplasmose, abordada neste estudo.

1.9 TOXOPLASMOSE: EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO

A toxoplasmose é uma doença infecciosa de grande importância médica e veterinária, sendo uma das zoonoses mais difundidas no mundo que tem como agente etiológico um protozoário conhecido como *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 2014). Estima-se que 20 a 90% da população mundial já entraram em contato com o parasito (SPALDING, 2005; VAZ et al., 2011).

Em gestantes, a prevalência de positividade pode ser maior ao redor do mundo, variando entre 51% a 72% na América Latina, 54% a 77% na África Ocidental, 4% a 39% no sudeste asiático, 58% nos países europeus e 15% na América do Norte (PAPAS, 2009) (Figura 9). Altas taxas de incidências ocorrem em regiões de clima quente, áreas tropicais de baixas latitudes e clima seco, como é o caso do Brasil (DUBEY et al., 2012; GRIGG; DUBEY; NUSSENBLATT, 2015).

Figura 9 – Distribuição geográfica dos genótipos de *T. gondii*. Os pontos pretos indicam localizações das quais os isolados de *T. gondii* foram obtidos e genotipados usando o método de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism*). Os tamanhos dos gráficos de pizza correlacionam-se com o número total de isolados (n) e as cores indicam diferentes genótipos.



Fonte: adaptado de SHWAB et al. (2013).

No Brasil, a prevalência de toxoplasmose varia de acordo com a região estudada. Dados limitados indicam que em certas regiões do Brasil (especialmente a região Sul) aproximadamente 50% das crianças foram expostos ao parasita. Altas taxas de soroprevalência

(36-92%) foram encontradas em mulheres grávidas (DUBEY et al., 2012). Em um estudo envolvendo 20.389 mulheres gestantes da região sul do Brasil, 53,03% das mulheres possuíam anticorpos IgG para *T. gondii* e 3,26% foram positivas para IgM (VAZ et al., 2010). Esses dados indicam que a soroprevalência de *T. gondii* em crianças e em mulheres grávidas no Brasil é uma das maiores em todo o mundo (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2012).

Atualmente, o município de Santa Maria – RS, enfrenta um dos maiores surtos de toxoplasmose registrados no Brasil segundo o último boletim epidemiológico divulgado pela Superintendência de Vigilância em Saúde (07/09/2018). De acordo com o boletim divulgado pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde, o número total de notificações relacionadas à doença foi 1.885 sendo destes 748 casos confirmados dentre os quais 85 casos em gestantes, sendo 3 óbitos fetais, 4 abortos (14 semanas), 17 casos de toxoplasmose congênita segundo o balanço mais recente.

Apesar de ser uma doença infecciosa, a toxoplasmose deve ser considerada importante em duas populações: pacientes imunodeprimidos e fetos de mulheres que adquiriram a infecção durante a gestação. Em indivíduos imunodeprimidos (pacientes infectados pelo vírus HIV, pacientes que sofreram transplante de órgãos ou pacientes em tratamento quimioterápico) infectados com *T. gondii* podem desenvolver lesões graves, resultante de uma infecção aguda ou de reativação de uma infecção latente (KODYM et al., 2015). As principais manifestações clínicas incluem: encefalite, hepatite, pneumonia e retinocoroidite (MACHALA et al., 2013). No segundo caso, uma infecção materna aguda durante a gestação pode induzir a transmissão vertical do parasito e, conseqüentemente, infecção ao feto (BARRAGAN e SIBLEY, 2003). O risco de infecção fetal depende da idade gestacional da mãe, da competência imunológica da mesma durante a parasitemia, da carga parasitária e da virulência da cepa infecciosa (ELSHEIKHA, 2008). Um estudo clássico de Sabin (1942) descreveu um quadro de sintomas clínicos da toxoplasmose congênita: microcefalia ou anencefalia, calcificação intracraniana, anormalidades mentais e coriorretinite.

Infecções por *T. gondii* adquiridas durante o primeiro trimestre de gestação resultam em 10% a 25% de casos de toxoplasmose congênita, enquanto que no segundo e terceiro trimestre a incidência de infecção fetal varia de 30% a 65%, respectivamente (ELSHEIKHA, 2008; HILL e DUBEY, 2018). Nestes casos, mães infectadas durante o início da gestação podem apresentar abortos e morte fetal, ou levar ao nascimento de crianças prematuras debilitadas, com deficiência física e/ou mental, hidrocefalia e cegueira (GOMES e BARBOSA, 2017). Nos recém-nascidos, as manifestações clínicas podem variar e se desenvolver em diferentes períodos, sendo que na maioria dos casos podem não aparecer. No entanto, em casos

assintomáticos, pode-se observar linfadenopatia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia, hiperbilirrubinemia, anemia e trombocitopenia (KHAN e KHAN, 2018).

1.9.1 *Toxoplasma gondii*: origem e classificação taxonomica

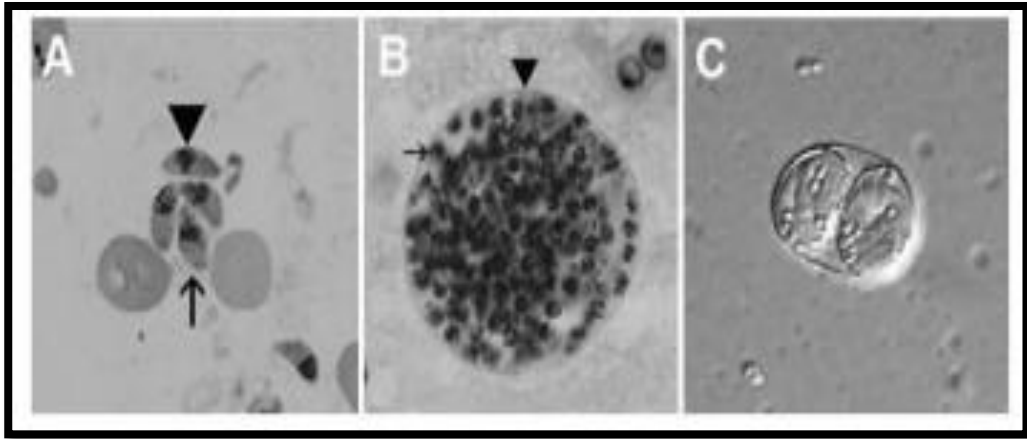
Taxonomicamente, o *T. gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909) causador da toxoplasmose, é um parasito pertencente ao Filo Apicomplexa (LEVINE 1970), classe Coccidia (LEUCKART, 1879), Ordem Eucoccidiorida (LÉGER e DUBOSCQ, 1910), Subordem Eimeriorina (LÉGER, 1911), Família Sarcocystidae (POCHE, 1913), subfamília Toxoplasmatinae (BIOCCA, 1956), Gênero *Toxoplasma* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909). O protozoário *T. gondii* foi reconhecido pela primeira vez no Brasil, pelo Instituto Biológico de São Paulo (1908) ao observarem corpúsculos parasitários em coelhos. Lesões semelhantes as provocadas pelo conhecido parasito *Leishmania*, porém com características peculiares que questionaram Splendore (1908) a realizar extensas pesquisas envolvendo este novo protozoário e sua relação com as células intracelulares.

No mesmo ano, Nicolle e Manceux (1908) no Instituto Pasteur de Tunis identificaram o parasito em roedores (Gundi - *Ctenodactylus gundi*) e o nomearam de *T. gondii*, baseados na morfologia (*toxon* = arco, *plasma* = vida) e no hospedeiro (*gundi*). Em 1923, foi descrito o primeiro caso de toxoplasmose humana em uma criança de 11 anos de idade que apresentava hidrocefalia e microftalmia (KHAN e KHAN, 2018). Dez anos depois (1937), o *T. gondii* foi reconhecido como o agente causador de encefalomielite em crianças recém-nascidas, sendo que cinco anos mais tarde comprovou-se a sua transmissão vertical em humanos (TENTER et al., 2000). Apesar de várias pesquisas envolvendo o *T. gondii* terem sido realizados desde o início do século XIX, somente na década de 1960 o ciclo biológico do parasito foi elucidado, ao demonstrar estágios infecciosos de *T. gondii* nas fezes de gatos, e que estes poderiam transmiti-los a hospedeiros intermediários (DUBEY 1998; 2012).

1.9.2 Formas infecciosas

Até então, três formas evolutivas infecciosas do *T. gondii* são reconhecidas: os taquizoítos (agrupam-se em clones), bradizoítos (presente em cistos teciduais) e oocistos (forma infectante) (DUBEY 1998, 2012, 2014) (Figura 10).

Figura 10 - Formas infectantes de *T. gondii*. Infecções agudas são caracterizadas por formas de crescimento rápido (taquizoítos) (A) enquanto infecções crônicas resultam da transformação de uma forma semi-dormente chamada de bradizoíto (B) em oocistos esporulados ou não esporulados (C).



Fonte: Adaptado de DUBEY (2010).

Frenkel (1973) foi o primeiro a descrever a morfologia dos taquizoítos (do Grego tachos = *veloz*). Os taquizoítos são estruturas celulares arqueadas capazes de invadir todos os tipos de células, sendo considerados os estágios de multiplicação e de disseminação rápida (DUBEY, 1998). Possuem aproximadamente 6 μm de comprimento e 2 μm de largura podendo serem encontrados durante a fase aguda da infecção, também denominada forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2003) (Figura 10A). Durante a fase aguda, a qual geralmente ocorre dentro de 8 a 12 dias após a infecção, os taquizoítos são capazes de atravessar as barreiras teciduais como a BHE e transplacentária, podendo atingir o SNC e o feto (BARRAGAN e SIBLEY, 2003). Nesta fase da infecção, os taquizoítos se multiplicam por endodiogenia, no interior de seus vacúolos parasitóforos. O citoplasma torna-se repleto de taquizoítos a ponto de eclodir e provocar a liberação dos taquizoítos, que invadem as células contíguas ou são fagocitadas (WEISS e KIM, 2007). Esta multiplicação proliferativa favorece a infecção em diversos locais do organismo, como o SNC, olhos, musculatura esquelética, musculatura cardíaca e a placenta (BARRAGAN e SIBLEY, 2003).

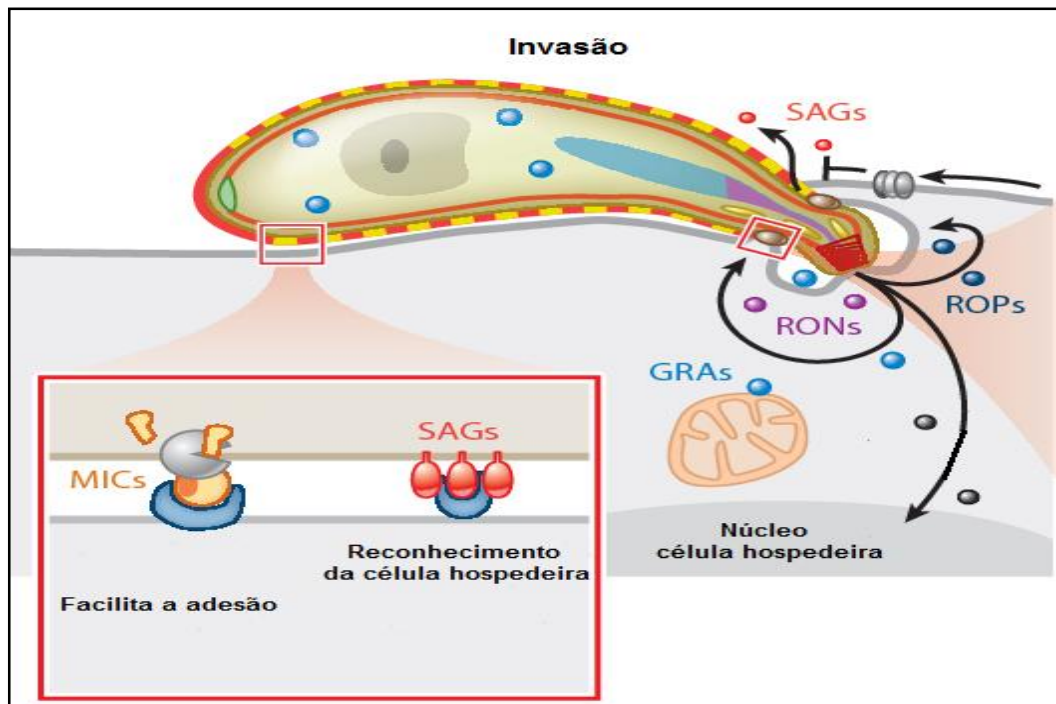
Alguns desses taquizoítos iniciam uma segunda fase de desenvolvimento; ou seja, como bradizoítos. Os bradizoítos constituem a forma de resistência do *T. gondii* nos tecidos (do Grego *brady* = *lento*), sendo os principais sítios de infecção o miocárdio, cérebro e musculatura esquelética (FRENKEL, 1973). Os bradizoítos incidem na fase crônica da infecção e diferem morfológicamente pouco dos taquizoítos (Figura 10B). Na fase crônica, a multiplicação do

parasito diminui de forma acentuada e a infecção é mantida por um longo período na forma latente através da formação de cistos teciduais repletos de bradizoítos (DUBEY, 1998; HILL e DUBEY, 2018). Os cistos teciduais apresentam parede elástica (<0,5 µm de espessura), com tamanho variando de 5 a 70 µm de diâmetro e podem conter centenas de bradizoítos no seu interior, multiplicando-se lentamente por endodiogenia e pode persistir por toda a vida do hospedeiro (HILL e DUBEY, 2018). Normalmente, os cistos apresentam uma predileção pelo SNC, músculos esqueléticos e cardíacos que constituem tecidos mais irrigados, sendo que alguns estudos mostram a presença de cistos teciduais também em pulmão, fígado e rins (WATTS et al., 2015). A forma de estágio de oocistos teciduais de *T. gondii* é o principal responsável pela transmissão da toxoplasmose de animais para humanos que normalmente se dá através da ingestão de alimentos ou água contaminada (DUBEY, 1998; HILL e DUBEY, 2018).

A última forma de estágio de *T. gondii* são os oocistos. Oocistos não esporulados; ou seja, não infectantes, possuem aspectos subsféricos a esféricos e medindo de 10 a 12 µm de diâmetro. Enquanto, os oocistos esporulados (forma infectante) apresentam aspectos subsféricos a elípticos e medem 11 a 13 µm de diâmetro. Cada oocisto contém no seu interior dois esporocistos elípticos, medindo de 6 a 8 µm (DUBEY, 1998; HILL e DUBEY, 2018) (Figura 10C). Os oocistos são resistentes a vários processos de inativação, permanecendo viáveis após contato com agentes químicos como ácido sulfúrico 2% ou em dicromato de potássio a 2,5%. Desta forma, resistem mesmo em temperaturas muito baixas (-20°C) a elevadas (>37°C) por meses, infectando água e alimentos (DUBEY, 2014, p.15).

Taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos são semelhantes estruturalmente, possuindo, porém, diferenças nas suas diversas organelas as quais desempenham papéis fundamentais nos processos de interação com a célula hospedeira, movimentação, adesão e invasão (BLADER et al., 2015). Nesses processos estão envolvidos os antígenos de superfície (SAG), e proteínas presentes em organelas do complexo apical, como as proteínas de micronemas (MIC), proteínas de roptrias (ROP) e proteínas de grânulos densos (GRA) (Figura 11).

Figura 11- Mecanismo de invasão do *T. gondii* em uma célula hospedeira. SAGs: proteínas de superfície; ROP: organelas em com atividade enzimática; GRA: organelas envolvidas na maturação do vacúolo parasitóforo.



Fonte: adaptado de BLADER et al. (2015).

As SAGs são proteínas ancoradas na superfície celular do *T. gondii* por âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) e funcionam como ligantes que facilitam a adesão do parasito à célula hospedeira (CHARLES et al., 2007). SAG1 (30 kDa) é a proteína predominante na superfície de taquizoítos de *T. gondii*, sendo utilizada em vários testes de diagnósticos (BUFFOLANO et al., 2005; CARVALHO et al., 2008) e em ensaios vacinais (LIU et al., 2008). As proteínas do micronema são também proteínas facilitadoras nos processos de adesão e invasão do *T. gondii* na célula hospedeira. Das inúmeras proteínas do micronema, a MIC3 (90kDa) é uma potente adesina presente em todos os estágios infecciosos de *T. gondii*, a qual tem sido utilizada em testes sorológicos (BUFFOLANO et al., 2005; JIANG et al., 2008) e candidata a compor uma vacina contra toxoplasmose (JONGERT et al., 2008).

As ROP, por sua vez, são organelas em forma de bastão encontradas na região anterior do *T. gondii* apresentando proteínas com atividade enzimática (proteíno-quinases, fosfatases e proteases) (DUBEY et al., 1998). Seu conteúdo está envolvido na penetração do parasito e na formação do vacúolo parasitóforo (forma encistada) na célula hospedeira (DUBEY et al., 1998). Por fim, as GRA são organelas envolvidas na maturação do vacúolo parasitóforo, caracterizadas por nanotubos membranosos (HOLEC-GAŞIOR e KUR, 2010), assim como são as principais

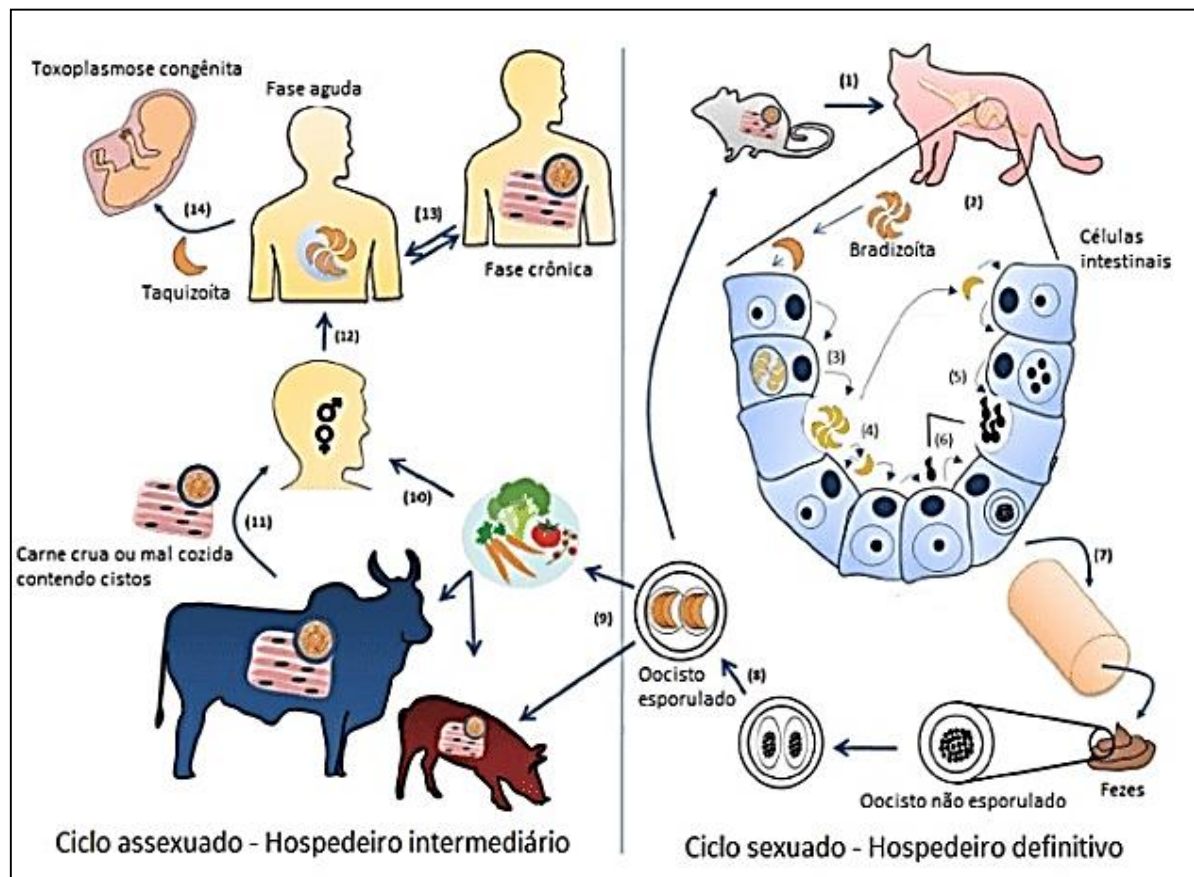
porções de antígenos excretórios/secretórios de *T. gondii*, estando associadas à construção da rede membranosa intravacuolar que permite a interação do parasito com a célula hospedeira.

1.9.3 Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *T. gondii* é do tipo heteroxeno, ocorrendo em duas fases distintas (Figura 12). A fase sexuada é enteroepitelial e ocorre apenas no hospedeiro definitivo (HD), sendo o HD membros da família *Felidae* (DUBEY, 2014). Enquanto a fase assexuada acontece na face extraintestinal em tecidos do hospedeiro intermediário (HI), esses podem ser qualquer animal de sangue quente incluindo o homem (DUBEY, 2014). Os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos, ao penetrarem no epitélio intestinal dos felídeos, sofrem um processo de multiplicação por endodiogenia e merogonia, dando origem a vários merozoítos. O rompimento da célula parasitada libera os merozoítos que penetram em novas células epiteliais e se transformam nas formas sexuadas, os gametócitos, que, após o processo de maturação, formam os gametas masculinos (microgametas) e/ou os gametas femininos (macrogametas). O macrogameta (imóvel) permanece dentro de uma célula epitelial, enquanto os microgametas (móveis e flagelados) saem de sua célula e fecundam o macrogameta, formando o ovo ou zigoto (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Este evolui dentro do epitélio formando uma parede externa dupla, dando origem ao oocistos. Os oocistos não esporulados (Figura 12) são eliminados junto as fezes, portanto a esporulação ocorre no ambiente, em média até cinco dias após a excreção, dependente da temperatura e umidade (DUBEY, 1998).

Os HI, como o homem, por exemplo, podem adquirir a infecção pela ingestão de oocistos esporulados presentes em alimentos e água contaminados, caixas de areia, ingestão de cistos contendo bradizoítos em carne crua ou mal-cozida e ingestão de taquizoítos em líquidos biológicos (leite, saliva e esperma). Além disso, as formas acidentais de contaminação por auto-inoculação, transplante de órgãos e transmissão congênita podem ocorrer (DUBEY 1998; 2012; HILL e DUBEY, 2018).

Figura 12- Ciclo Biológico de *Toxoplasma gondii*. Oocistos não esporulados são eliminados através das fezes de felídeos, sofrem esporulação no ambiente e podem contaminar água e alimentos. Uma vez ingerido cistos contendo bradizoítos, homem e animal adquirem a toxoplasmose.



Fonte: adaptado de SOUTO (2013).

1.9.4 Linhagens clonais

Inicialmente a caracterização genotípica da população de *T. gondii* por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism*) revelou o predomínio de três linhagens clonais designadas como cepas tipo I, II e III com menos de 1% de diferença ao nível genômico (HOWE e SIBLEY, 1995; FERREIRA et al. 2004). Essa tipagem genética, capaz de diferenciar os três principais genótipos de *T. gondii*, baseou-se principalmente em pacientes soropositivos e cepas isoladas principalmente na Europa e nos Estados Unidos da América. Entretanto, Khan et al. (2011) relataram uma quarta linhagem na América do Norte, referindo esta como “tipo 12”, até então, sem grandes classificações patofisiológicas.

Segundo Howe e Sibley (1995), as cepas de *T. gondii* classificadas como tipo I, incluem as RH, CAST e VEL. Estas linhagens são altamente virulentas e normalmente associadas aos casos humanos de toxoplasmose aguda. O genótipo tipo II, representante ME49, por exemplo, é predominante em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em casos de toxoplasmose ocular e congênita em humanos. A ME49 é menos virulenta que a cepa RH, porém pode levar a uma maior incidência de mortalidade dependendo da carga parasitária e resposta imune do hospedeiro. Cepas do tipo III, como a VEG, são consideradas moderadamente virulentas e mais comumente encontradas em animais. O genótipo III é geralmente sintomático em humano e responsável por infecções crônicas e assintomáticas em animais. A cepa VEG, tipo III utilizada neste estudo, tem sido empregada em estudos relacionados à infecção latente, já sendo caracterizadas por uma menor patogenicidade e pela formação de cistos teciduais (ROOS et al., 1994).

1.9.5 Subversão da resposta imune por *T. gondii*

Tipicamente, a infecção por *T. gondii*, resulta na indução de uma resposta imunológica celular e humoral com produção de citocinas pró e antiinflamatórias responsáveis pelo controle da infecção (KRISHNAMURTHY et al., 2017).

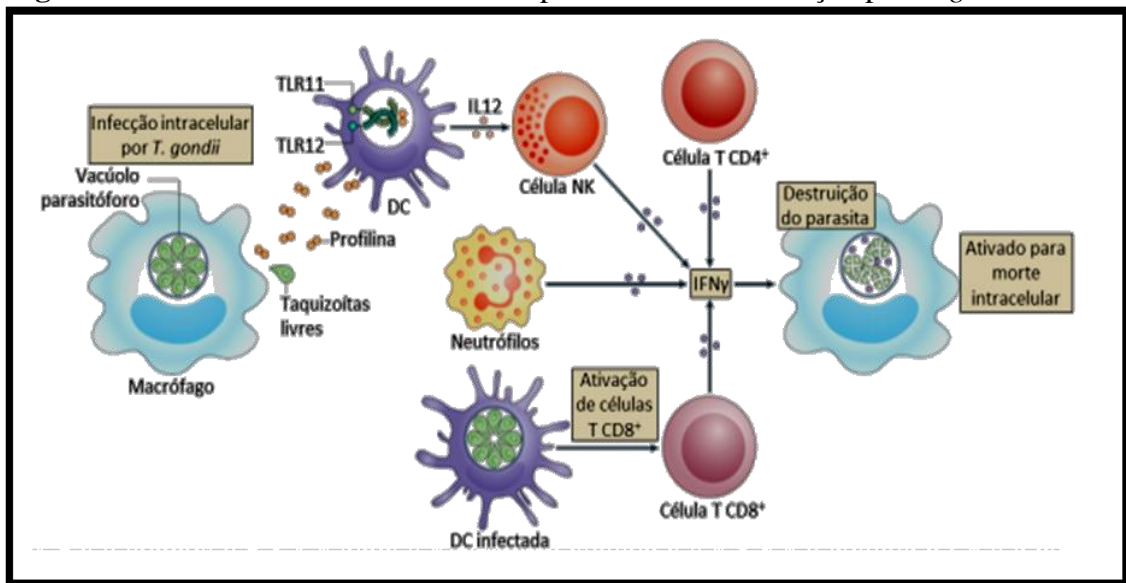
Receptores de reconhecimento da proteína de ligação à actina (profilina) denominados *Toll-Like Receptors* (TLR) presentes nas células dendríticas, estão envolvidos no mecanismo de sinalização celular (HOU et al., 2011) (Figura 13). Um estudo, utilizando ratos *knockout* MYD88 (proteína 88 de diferenciação mielóide a resposta imune primária) em TLR demonstraram ter uma produção defeituosa da IL-12 e menor liberação de IFN- γ após a infecção por *T. gondii* (YAROVINSKY et al., 2006), concluindo-se que a ativação de MYD88 por TRL em células dendríticas (CDs) conduz a ativação de IL-12. Contudo, a deficiência de TRL4 está envolvida com a produção de IL-6, INF- γ e IL-12, responsáveis por promover o aumento da carga parasitária no SNC.

Mecanismos moleculares e de resposta imune inata, revelaram que TRLs tipo 11 e 12 (TRL11 e TRL12), presente em animais e humanos respectivamente, estão envolvidos na resposta imune inata contra *T. gondii* através do reconhecimento da profilina liberada pelo parasito (YAROVINSKY, 2014). A MYD88 na presença de IRF8 induz a transcrição da IL-12 nas CDs (Figura 13).

Assim que o *T. gondii* entra em contato com as células epiteliais do hospedeiro uma proteína (profilina) é liberada pelo parasito. A profilina é reconhecida pelos receptores TLR 11 e/ou TRL 12 das CDs. As CDs ativadas secretam IL-12 (A) a qual, estimula as células NK

a apresentar para as células TCD4⁺ e produzir INF- γ (C) que levará a apoptose do parasito. As CDs infectadas apresentam o antígeno parasitário para as células TCD8⁺, que irá produzir IL-10 (D). Uma vez infectados pelos taquizoítos o INF- γ ativa os macrófagos (B). Macrófagos ativados, podem responder estimulando as enzimas idoleamina ou iNOS (E) a privação do triptofano essencial ao desenvolvimento do parasito ou a produção de óxido nítrico (ON) levando a destruição do vacúolo parasitóforo (Figura 13) (YAROVINSKY (2014).

Figura 13- Mecanismos de defesa do hospedeiro frente à infecção por *T. gondii*.



Fonte: adaptado de YAROVINSKY (2014).

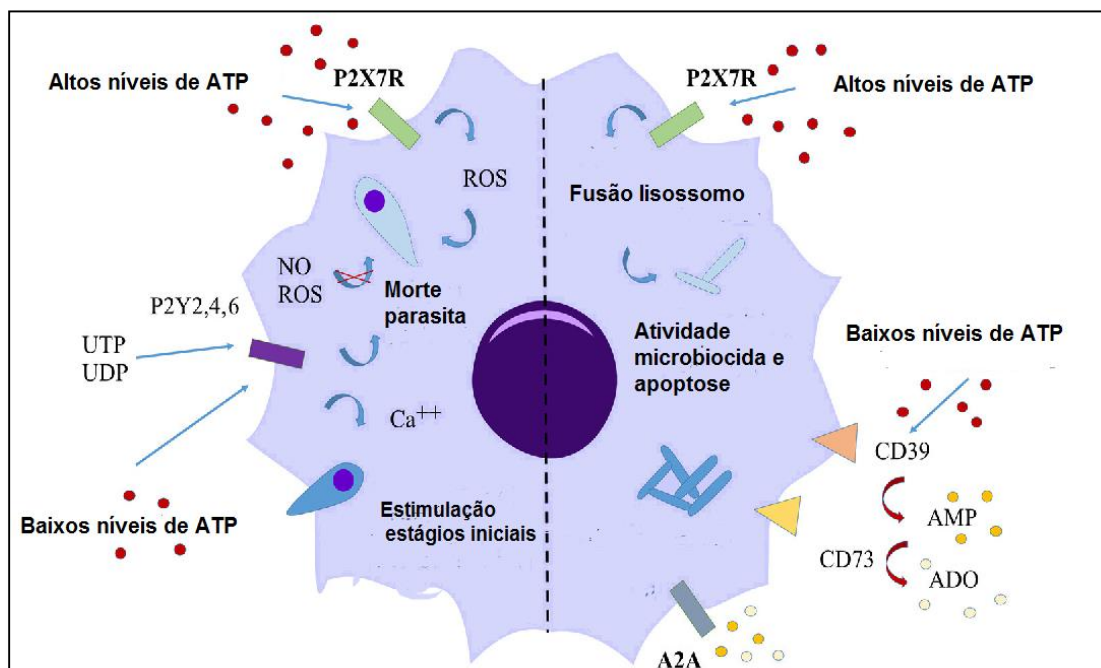
Já a imunidade adaptativa contra *T. gondii* é desempenhada através da apresentação de antígenos de superfície pelo complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) de CDs e macrófagos e MHC-I de células nucleadas. As duas principais populações de células T ativadas por este mecanismo são os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. A resposta humoral adaptativa contra *T. gondii* é desencadeada pelas células B, as quais desempenham um papel importante para o controle de cistos teciduais. Além disso, essas células são essenciais para a geração de respostas imunes mediadas por anticorpos.

1.9.6 Estimulação do sistema purinérgico por *T. gondii*

As células da linhagem de macrófagos/CDs representam uma das primeiras linhas de defesa contra uma infecção, e são os principais alvos celulares para a invasão por *T. gondii*. Devido à sua importante contribuição para a eliminação de patógenos, vários estudos têm sido

focados no papel desempenhado pela via purinérgica em influenciar a apoptose de macrófagos. Corrêa et al. (2010) demonstraram que a estimulação de macrófagos murinos com 3 mM de ATP por 30 min desencadeou a eliminação do parasita de maneira dependente do receptor P2X7. Esta morte celular foi associada com um aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) em macrófagos infectados após a estimulação de ATP. Pesquisadores confirmaram esses dados em murinos e forneceram evidências de que a morte do *T. gondii* pode ser mediada pelo receptor P2X7 e independe da secreção de ON, mas está associada à apoptose de células hospedeiras (LEES et al., 2010). No geral, esses dados sugerem um mecanismo de conservação do ATP no controle de infecções parasitárias, como é o caso da toxoplasmose. Altas concentrações de ATP ativam o P2X7 e podem induzir a apoptose de células infectadas levando à morte do parasito.

Figura 14 - Ação do ATP extracelular na resposta de macrófagos contra *T. gondii*. Altas concentrações de ATPe (3-5 mM) induzem a ativação do P2X7 em macrófagos infectados por *T. gondii* e induzem a morte do patógeno em ambos os casos. A morte do parasita é dependente da geração de ROS. Por outro lado, baixos níveis de ATPe (100 μ M) são rapidamente convertidos em AMPe e ADOe via CD39 e CD73. ADOe liga-se ao receptor A_{2A} e controlam a infecção contra *T. gondii* sem afetar a morte de macrófagos ou a produção de ON ou ROS.



Fonte: adaptado de PETIT-JENTREAU; TAILLEUX; COOMBES (2017).

Huang et al. (2016) demonstraram que camundongos *knock-out* para o receptor P2X7 apresentam maior susceptibilidade a infecção por *T. gondii* (cepa RH) durante uma infecção

oral apresentando elevado número de taquizoítos no intestino de animais infectados 5 dias após a infecção comparados com os camundongos selvagens. A alta suscetibilidade de camundongos *knock-out* para o receptor P2X7 infectados por *T. gondii* em relação ao seu equivalente selvagem também foi confirmada em um modelo de toxoplasmose aguda (HUANG et al., 2016). Os camundongos *knock-out* para o receptor P2X7 sucumbiram mais rapidamente à infecção, perderam mais peso, tiveram maior carga parasitária e produziram menos citocinas pró-inflamatórias do que os camundongos selvagens após infecções intraperitoneais com duas cepas diferentes: RH ou ME49 (MILLER et al., 2011; CORRÊA et al., 2016).

Durante a última década, modelos *knock-out* para enzimas envolvidas na degradação do ATPe têm sido utilizados para determinar o papel dos nucleotídeos purinérgicos na resposta imune contra patógenos intracelulares (ANTONIOLI et al., 2013). A CD39 é a primeira enzima envolvida na degradação do ATP, hidrolisando o ATPe em AMPe, conforme abordado anteriormente. Em contraste com a CD39, o papel da CD73 no resultado de infecções intracelulares *in vivo* são melhores descritas. A CD73 está envolvida na conversão do AMP em ADO, pois é uma proteína de superfície ligada a glicosilfosfatidilinositol expressa pela maioria das células imunes, mas não é altamente expressa pelos macrófagos (DUBOIS-COLAS et al., 2014). No contexto da infecção, a maioria dos estudos foram realizados usando camundongos *knock-out para CD73*. Pesquisadores forneceram a primeira evidência de um papel para CD73 na infecção por *T. gondii*, isto é, após infecção oral com *T. gondii*, camundongos deficientes para CD73 foram mais resistentes à infecção crônica, exibindo diminuição da carga de cistos no cérebro em comparação com animais do tipo selvagem (MAHAMED et al., 2012). Os mesmos autores descreveram que, ao contrário da doença crônica, os camundongos deficientes para CD73 são altamente suscetíveis à toxoplasmose aguda devido a danos mediados pelo sistema imunológico (MAHAMED et al., 2015). Assim, a CD73 desempenha um papel na limitação do dano tecidual durante a infecção aguda pelo *T. gondii*.

1.9.7 Toxoplasmose tem tratamento?

Desde que os mecanismos de infecção e resposta imunológica foram reconhecidos, uma pequena variedade de quimioterápicos estão disponíveis para o tratamento da toxoplasmose. Segundo a World Health Organization (WHO), desde 1999, os tratamentos em casos de toxoplasmose congênita incluem dois protocolos terapêuticos amplamente utilizados, com pequenas modificações nas doses e tempo de administração dos quimioterápicos.

O tratamento de crianças infectadas congenitamente ou em gestantes consiste na combinação de pirimetamina e sulfadiazina ou clindamicina, acrescido folinato de cálcio

(PETERSEN, 2007). Ambas as drogas, pirimetamina e sulfadiazina, são antagonistas do folato, e atuam inibindo a duplicação do DNA e a enzima dihidrofosfato redutase. A clindamicina, por sua vez é um macrolídeo que apresenta efeitos tóxicos ao parasito através da ligação a açúcares presentes na membrana celular, além de inibir a síntese proteica (ANTCZAK; DZITKO; DŁUGOŃSKA, 2016). A Tabela 1 demonstra tratamento para infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes em diferentes estágios da gestação, bem como a indicação de tratamento para a toxoplasmose congênita segundo Remington et al. (2001).

Tabela 1- Modelo de tratamento em infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes e na infecção congênita.

Manifestação da Infecção	Medicação	Dosagem	Duração da Terapia
<i>Toxoplasmose materna aguda</i>	Espiramicina	1 g/kg de peso corporal a cada 8h antes das refeições	Até infecção fetal documentada ou excluída até 21 semanas, se documentada, alternando mensalmente com pirimetamina, ác. folínico e sulfadiazina
<i>Infecção fetal confirmada</i>	Pirimetamina e	50 mg/kg de peso corporal duas vezes ao dia durante 2 dias	
	Sulfadiazina e	75 mg/kg por 2 dias dividido em 2 doses	
	Ácido Folínico	10-20 mg/kg de peso corporal diariamente	Durante uma semana após tratamento com pirimetamina

Adaptada de: REMINGTON et al. (2001)

Em mulheres grávidas, o uso de espiramicina também é recomendado. Este quimioterápico atua inibindo a síntese proteica do parasito e é ainda, capaz de atravessar a barreira transplacentária atuando na redução da transmissão materno-fetal (MCCABE, 2001; KATZUNG, 2006). Similarmente como a maioria das drogas anti-*T. gondii*, a espiramicina atua somente nas formas taquizoíta do parasito (GRUJIC et al., 2005) e apesar de reduzir a frequência da transmissão, esse quimioterápico não altera a patologia da infecção fetal.

De modo geral, os quimioterápicos podem penetrar no fluido cefalorraquidiano, em concentrações terapêuticamente ativas, causando mielossupressão; devido a isso, as gestantes são orientadas a fazer uso do folinato de cálcio, um bloqueador do folato (PETERSEN, 2007). Além disso, as doses relativamente altas utilizadas podem, no entanto, conduzir a toxicidades,

leucopenia, trombocitopenia e erupções cutâneas (LOPES et al., 2007; KAPLAN et al., 2009) aumentando os efeitos colaterais ocasionados por esses quimioterápicos.

Entretanto, em um estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa os dados demonstraram que quando o quimioterápico é associado a antioxidantes, há um aumento na eficácia terapêutica e redução nos marcadores de lesão celular quando comparado aos animais somente tratados com o quimioterápico isolado (BOTTARI et al., 2015 a,b).

Diante da potencial gravidade das manifestações da toxoplasmose em imunodeprimidos e gestantes, bem como defeitos congênitos e toxicidade ocasionada pelos quimioterápicos disponíveis, se faz necessário à busca por novas drogas capazes de minimizar os efeitos colaterais e de combater o parasito. Nesse estudo, utilizamos o resveratrol (RSV), um composto natural com propriedades antioxidantes já bem elucidadas como alvo terapêutico para o tratamento da neurotoxoplasmose.

1.10 RESVERATROL: HISTÓRICO E POTENCIAL TERAPÊUTICO

Desde a antiguidade, os produtos naturais têm sido utilizados na prevenção e tratamento de diversas doenças ao longo da história, incluindo parasitoses. Em 1922, estudiosos e nutricionistas perceberam que a população francesa parecia ter uma longevidade maior quando comparada com o resto do mundo e associaram essa hipótese ao hábito dos franceses de consumir vinho, assim ficou instaurado o paradoxo francês (LIPPI; FRANCHINI; GUIDI, 2010). Com a pressuposição do paradoxo francês, muitos compostos a exemplo do RSV, foram identificados no vinho tinto e muitos deles compartilham uma estrutura química fenólica semelhante. O conteúdo médio de RSV em vinho tinto é de cerca de 1-3 mg/l (JEANDET et al., 2003), enquanto nos vinhos branco e rosa é de 0,011-0,547 mg/l (ROMERO-PÉREZ et al., 1996) e 0,07-1,06 mg/l (CVEJIC et al., 2010) respectivamente. Já os sucos de uva, apresentam quantidades variáveis de RSV em torno de 3-15 mg/l (OKUDA e YOKOTSUKA, 1996). Além do vinho, vários alimentos e produtos alimentícios como amoras, sucos de cranberry e o amendoim são conhecidos por conter RSV em menores quantidades (SANDERS; MCMICHAEL; HENDRIX, 2000). Entretanto, a uva parece ser fonte mais rica de RSV até então naturalmente disponível (WEISKIRCHEN e WEISKIRCHEN, 2016).

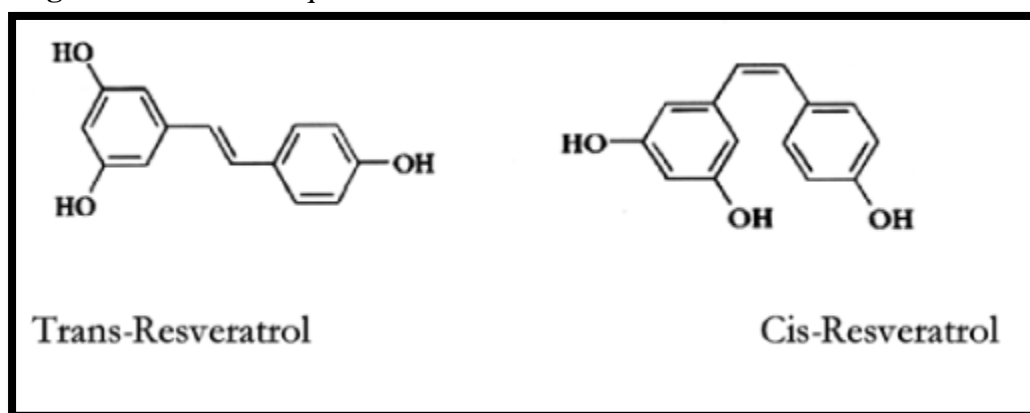
O RSV (3,4', 5-trans-tri-hidroxi-estilbeno ou 5 - [(E) -2- (4-hidroxi-fenil) -etil] benzeno-1,3-diol; C₁₄H₁₂O₃; peso molecular 228,25) é uma fitoalexina de ocorrência natural membro da família dos estilbenos fenólicos, que foi isolado pela primeira vez das raízes do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) em 1939 (TAKAOKA, 1939) e, mais tarde, das raízes de

Polygonum cuspidatum, uma planta tradicional chinesa e amplamente utilizada na medicina japonesa na década de 1960 (LEE et al., 2012)

O RSV é um composto polifenólico distribuído em cerca de 70 espécies, dentre as quais *Vitaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Gnetaceae*, *Cyperaceae* e *Leguminosa* (WANG; LIU; CHEN, 2013). Desde de sua descoberta, dezenas de estudos revelam que o resveratrol é capaz de prevenir ou retardar a progressão de uma grande variedade de doenças, incluindo o câncer (KO et al., 2017), as doenças cardiovasculares (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2016), as lesões isquêmicas (ABDEL-ALEEM, 2016) e as doenças neurodegenerativas (TELLONE et al., 2015).

Este composto é sintetizado praticamente na casca das uvas, onde é formado a partir da condensação de três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de p-coumaroil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima resveratrol sintase. Esta estrutura é sintetizada naturalmente sob duas formas isômeras: *trans* e *cis*-RSV (KING; BOMSER; MIN, 2006). O isômero *trans* é encontrado em maiores quantidades, e é responsável pelos efeitos biológicos do RSV (Figura 15).

Figura 15 - Estruturas químicas dos isômeros *trans*-RSV e *cis*-RSV.



Fonte: autor

Os resultados de estudos farmacocinéticos indicam que a biodisponibilidade oral do RSV é baixa, entretanto ele é rapidamente absorvido pelas células enteroepiteliais, de modo que baixas concentrações de RSV são indicadas como tratamento. Segundo Walle et al. (2004), cerca de 70% do RSV administrado via oral é absorvido, porém a maior parte dele é convertido nos seus conjugados, sulfato e glicuronídeo-RSV, revelando assim, a baixa biodisponibilidade tecidual. Além disso, o RSV tem uma meia-vida inicial curta de aproximadamente 8-14 minutos e rapidamente é metabolizado (BAUR e SINCLAIR, 2006). Absorvido no intestino por transporte passivo, a maior parte do RSV é metabolizado no fígado. As investigações sobre o metabolismo do RSV *in vivo* em modelos de roedores mostraram ser o fígado o principal local

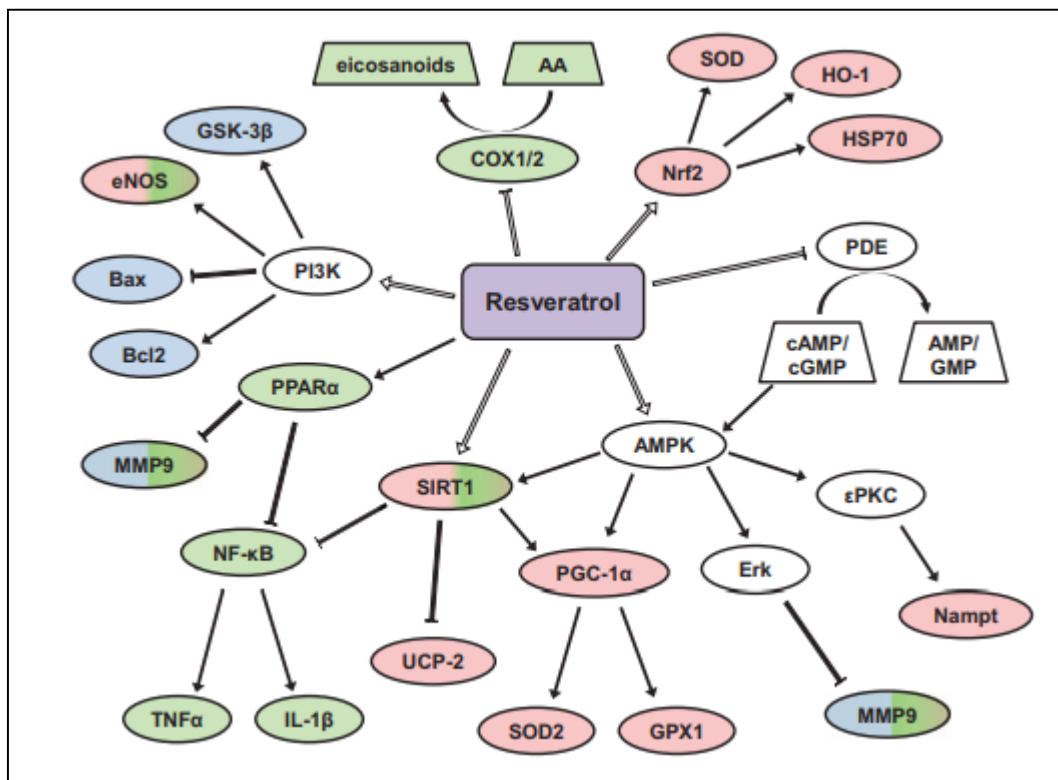
de acumulação para o resveratrol e seus metabólitos (SALE et al., 2004). Em indivíduos saudáveis, a excreção renal do RSV varia de 26-34% nas doses compreendidas entre 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹ (WALLE et al., 2004).

O RSV possui uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas estabelecidas que contribui para seus efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversas patologias conforme mencionado (WEISKIRCHEN e WEISKIRCHEN, 2016). Uma das mais conhecidas e importantes propriedades do RSV é sua alta capacidade antioxidante, atenuando os efeitos das espécies reativas produzidas no organismo (FRABRIS et al., 2008; PORRO et al., 2015). Tal propriedade está associada à estrutura química deste composto, pois os grupos hidroxilas dos anéis fenólicos do RSV agem como doadores de elétrons, sendo responsáveis pela capacidade de sequestrar e neutralizar o radical hidroxil e o ânion superóxido prevenindo dessa forma a peroxidação lipídica das membranas, a oxidação proteica e os danos ao DNA (FRABRIS et al., 2008).

Estudos demonstram que o RSV é capaz de aumentar a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX) (SCHMATZ et al., 2012). O RSV também aumenta a atividade da sirtuina 1 (SIRT1), um membro da família da nicotinamida adenina dinucleotídeo desacetilases, resultando em maior resistência ao estresse celular (SIN et al., 2015). Além das propriedades antioxidantes, o RSV é um importante neuroprotetor em condições de injúria cerebral e nos processos neurodegenerativos (BASTIANETTO; MÉNARD; QUIRION, 2015). De fato, o RSV tem mostrado seu efeito neuroprotetor reduzindo as lesões neuronais. Em nível de SNC, o RSV mostrou-se eficiente na prevenção de déficits de memória em modelos experimentais de Alzheimer (PASINETTI et al., 2015), uma vez que devido a sua elevada solubilidade lipídica, é capaz de atravessar a BHE e incorporar-se no tecido cerebral, contribuindo para seu efeito neuroprotetor.

Aliado a atividade antioxidante e neuroprotetora, o RSV possui efeitos antiinflamatórios. Estudos revelam que o RSV atua como antiinflamatório suprimindo a ativação do fator de transcrição nuclear κB (NFκB) em macrófagos ativados (HEYNEKAMP et al., 2006; DAS e DAS, 2007). Alguns estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram ainda que o RSV suprime significativamente a produção de interleucinas como a IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF-α (LIU et al., 2011; GATSON et al., 2013). O RSV inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias através de moléculas conhecidas como ciclooxigenases (COX), particularmente ciclooxigenase-1 (COX1), uma enzima envolvida na produção de citocinas (Figura 16).

Figura 16 - Vias de ativação reguladas pelo resveratrol (RSV). Este diagrama ilustra os fatores responsáveis por induzir um estado pró-sobrevivência após o tratamento com resveratrol no SNC. Note que alguns efetores, particularmente SIRT1, podem ser ativados ou inibidos por mais de um caminho. Setas com um ponto indicando ativação, enquanto setas com ponta plana indicam inibição. Caixas brancas indicam ativação/inibição por meio de um mecanismo indireto ou mal compreendido. Caixas verdes indicam o papel do RSV na inflamação. Caixas rosa indicam o papel do RSV no estresse oxidativo. Caixas em azul demonstram o papel do RSV na apoptose.



Fonte: adaptado de Lopez; Dempsey; Vemuganti (2015).

1.10.1 Propriedades neuroprotetoras do resveratrol em células cultivadas

Os efeitos neuroprotetores do RSV têm sido investigados em vários modelos *in vitro*, seja a partir de culturas primárias cerebrais neonatais ou a partir de linhagens celulares derivados do cérebro (KUMAR et al., 2016).

O tratamento com RSV demonstrou inibir a imunorreatividade do citocromo c e da atividade da capase-3 após isquemia focal em roedores adultos (ANDRABI et al., 2004), após hipóxia-isquemia em roedores neonatais (WEST et al., 2007) e após a privação de oxigênio-glicose em culturas neuronais primárias (GONG et al., 2007). É bem provável que o RSV restaure a proliferação das células após lesão isquêmica pela inibição da sinalização pelas proteínas fosfoinositídeo-3 quinase (PI3K)/Akt (ZHOU et al., 2014).

Além disso, os efeitos neuroprotetores do RSV podem ser vistos em culturas primárias de células microgliais (KUMAR et al., 2016). RSV (até 50 μ M) em cultura de células

microgliais obtidas de cérebro de ratos recém-nascidos e induzidos com LPS inibiu efetivamente a produção de prostaglandina E2 e suprimiu a expressão da COX-1 (BI et al., 2005). Desta forma, o RSV proporciona efeitos neuroprotetores contra a neuroinflamação em estudos *in vivo* e *in vitro*, resultando na modulação de diferentes vias de transdução de sinal.

Um estudo conduzido por Schmatz (2009) demonstrou que o tratamento com RSV aumentou a hidrólise dos nucleotídeos da adenina, sugerindo um aumento na produção de adenosina no SNC, que pode ter um importante papel neuroprotetor sob condições fisiopatológicas em ratos. Xu et al. (2015) demonstraram que o RSV atenua a expressão de receptor P2X7 induzida por altas concentrações de ácidos graxos em cultura de células. Recentemente, Xie et al. (2017) também demonstraram o envolvimento do RSV com receptores P2X7; isto é, sobre a transmissão da dor induzida por P2X7 em estados de dor neuropática.

Em um estudo envolvendo o RSV como influenciador da neurogênese pesquisadores (TORRES-PÉREZ et al., 2015) revelaram que o RSV induz alterações neuroplásticas, neurogênese e memória em camundongos de seis meses de idade. Recentemente, Li et al. (2018) revelaram que RSV melhora o comportamento ansiolítico, o medo e o déficit de memória em ratos submetidos ao modelo de estresse pós-traumático.

Considerando os benefícios farmacológicos deste composto natural, suas ações terapêuticas e farmacológicas, no presente estudo utilizamos o RSV, um composto natural com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias já bem elucidadas como alvo molecular para o tratamento da toxoplasmose. Isso porque, estudos anteriormente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a associação de um antioxidante como o RSV para ao tratamento da toxoplasmose, foi capaz de evitar danos oxidativos e perda de memória em camundongos infectados com *T. gondii*. Além disso, o RSV modulou a resposta inflamatória em camundongos experimentalmente infectados reduzindo o número de cistos teciduais (BOTTARI et al., 2015 a,b).

Tendo em vista que o *T. gondii* é capaz de ocasionar alterações neuroquímicas e o RSV exerce um papel significativo na regulação de funções importantes no SNC, especialmente sob condições patológicas, na presente tese investigamos os mecanismos de ação do RSV na neurogliogênese e na sinalização purinérgica de embriões e animais adultos infectados experimentalmente com *T. gondii*. A hipótese que pretendeu-se avaliar foi se o RSV seria capaz de favorecer a proliferação e diferenciação de CPNs infectadas por *T. gondii* através da neurogliogênese? Ainda, uma modulação do sistema purinérgicos pelo RSV minimizaria o processo patológico da toxoplasmose através da inibição de citocinas inflamatórias?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos do RSV na proliferação/auto-renovação, migração e morte de células progenitoras neurais (CPNs) obtidas de embriões infectados *T. gondii*; assim como verificar os efeitos do *T. gondii* na sinalização purinérgica associados à neuroproteção mediada pelo RSV em CPNs e em córtex de camundongos adultos experimentalmente infectados.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a ação do RSV na proliferação, migração, morte e destino neural bem como na neurogênese x gliogênese de CPNs obtidas do telencéfalo de embriões infectados com *T. gondii*.
- Investigar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-NT e ADA e dos receptores P2X7 e A_{2A} em CPNs infectadas e na presença de RSV.
- Verificar a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias na resposta a infecção por *T. gondii*.
- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-NT, ADA e os receptores P2X7, P2Y1, A1 e A_{2A} em córtex de animais adultos infectados por *T. gondii* e tratados com RSV.
- Determinar danos oxidativos provocados pelo *T. gondii* através dos níveis de ROS e TBARS em córtex de animais infectados e tratados.
- Determinar os efeitos neuroprotetores e neuromoduladores do RSV em CPNs e cérebro de animais adultos infectados com *T. gondii*.

3.ARTIGO E MANUSCRITOS

Artigo 1: Publicado

Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii*

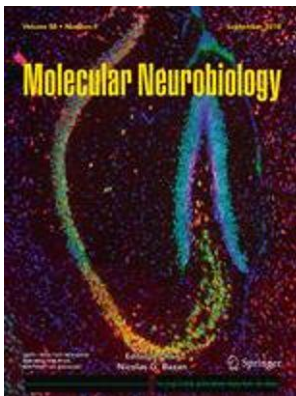
Dados sobre o periódico: Molecular Neurobiology

ISSN: 1559-1182

Fator de Impacto: 5.07

Qualis Capes: A1

Endereço eletrônico: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1180-z>



**Resveratrol as a therapy to restore neurogenesis of neural progenitor cells infected
by *Toxoplasma gondii***

Nathieli B. Bottari^a, Maria Rosa C. Schetinger^a, Micheli M. Pillat^{a,b}, Thais V. Palma^a,
Henning Ulrich^b, Mariana S. Alves^a, Vera M. Morsch^a, Cinthia Melazzo^a, Luiz Daniel de
Barros^d, João Luis Garcia^d, Aleksandro Schafer Da Silva^{a,c*}

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

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Universidade de São Paulo (USP), São
Paulo, SP, Brazil.

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

^d Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Londrina, Paraná (PR), Brazil.

*Author for correspondence: Department of Biochemistry and Molecular Biology
Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima, nº1000, Camobi District, Zip Code
97105900, Santa Maria, Brazil. E-mail: nathieli_bb@hotmail.com;
aleksandro_ss@yahoo.com.

Abstract

The intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* may cause congenital toxoplasmosis and serious brain damage in fetus. However, the underlying mechanism of neuropathogenesis in brain toxoplasmosis remains unclear. For this study, neural progenitor cells (NPCs) were obtained from embryo telencephalons (embryonic day 13) and induced to proliferation in the presence of growth factors (GFs). For gathering insights into the biological effects of resveratrol (RSV) on neurogenesis, this study aimed to investigate effects of RSV concentrations (0.1 to 100 μ M) on proliferation, migration and differentiation of NPCs infected by *T. gondii*. *T. gondii* infection increased the presence of cells in G0/G1 phase, reducing the global frequency of undifferentiated cells in S and G2/M phases of cell cycle and induced apoptosis of infected NPCs. Moreover *T. gondii* stimulated neural migration and gliogenesis during brain development. However, the treatment with RSV stimulated cell proliferation, restored cellular viability in infected NPCs and exert an inhibitory effect on gliogenesis of infected NPCs favoring neuronal maturation during toxoplasmosis infection. Thus, we have successfully demonstrated that RSV is promising as therapeutic for congenital toxoplasmosis.

Key-words: neurogenesis; resveratrol; proliferation; differentiation; *T. gondii*

1. Introduction

Toxoplasma gondii is a neurotropic intracellular parasite that infects any warm-blooded animals, capable of causing toxoplasmosis [1]. The congenital toxoplasmosis has been regarded as the most serious outcome of *T. gondii* infection in worldwide and still has a high incidence in live births [2].

There is a close relationship between congenital toxoplasmosis and the appearance of neurodegenerative disorders that can lead to irreversible injuries to the fetus brain [3]. Congenitally infected children usually show clinical signs consist of hydrocephalus and frequently low intelligence quotients [4, 5]. In pregnant women, *T. gondii* can cause abortion, stillbirth or brain abnormalities with detrimental consequences for the fetus [6].

Experimental evidence exists that *in vitro* inoculation with *T. gondii* induces apoptosis of neural stem cells (NPCs) reducing proliferation rates during cellular differentiation [7] and the parasite is capable of infecting and encysting in both astrocytes and neurons, the major central nervous system (CNS) cell types implicated during a chronic infection [8].

Neurons, astrocytes and microglial cells in the CNS are highly sensitive to *T. gondii* infection, especially in toxoplasmic encephalitis [9], and during brain development. One of the most important steps during brain development is the generation of cellular diversity and the neural fate decision to form neurons or glial cells. In this study, we suggest novel functions for resveratrol (RSV), a natural compound with health benefits, promoting neurogenesis during toxoplasmosis infection.

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a polyphenolic phytoalexin abundant in grapes, peanuts, mulberries and red wine [10]. This compound has protective effects against oxidative stress, immune response and celular damage [11, 12]. Furthermore, RSV protected neurons against degeneration in experimental models of ischemic stroke, Alzheimer disease, and

Parkinson disease [13, 14]. RSV has been investigated for treatment of toxoplasmosis in mice experimentally infected with *T. gondii* revealing significant results such as decreases brain damage and cyst numbers [15]. In view of the cited recent results, the present study is expected to provide interesting insights into the effect of RSV in cell fate determination during the process of neural differentiation [16].

Thus, to further elucidate the mechanisms of RSV on neuropathogenesis of congenital toxoplasmosis, this study aimed to investigate cellular and molecular mechanisms mediated by RSV on NPCs from embryos infected with *T. gondii* as restorative therapy recovering from the loss of NPCs and neurogenesis.

2. Experimental procedures

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 boxes containing five animals each, under a 12h light/dark cycle with controlled temperature and humidity (25°C, 70% respectively). All animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, protocol number 95090109/15). The animals went through an adaptation period of 10 days and were fed with commercial feed and water *ad libitum*. The animals were infected experimentally with *T. gondii* tachyzoites from VEG strain (type III) orally. Twenty days post infection the female mice were mating with male mice.

2.2 Resveratrol

Resveratrol (C₁₄H₁₂O₃; molecular weight 228.25 g/mol; purity >98, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and added to NPCs culture at concentrations from 0.1 to 100 μM prior to induction of differentiation.

2.3 Isolation and culture of Neural Progenitor Cells (NPCs)

NPCs were isolated from the embryonic day13 (E13) telencephalons of embryonic mice according to the methodology described by Hutton and Pevny [17]. Embryonic telencephalons were dissected and incubated with 0.1 % trypsin for 5 min at 37°C an equal volume of fetal bovine serum (FBS) was added for the inactivation of trypsin [18]. The cells were further mechanically dissociated. The cells were plated at a density of 2x10⁵ cells/mL in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 culture medium supplemented with 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) and antibiotics (100 units/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin) and cultured at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% of CO₂ during 5 days. Growth and sizes of neurosphere were measured using ImageJ software, and the results expressed as numbers and sizes of neurosphere, respectively.

2.4 Cell cycle and cellular viability of NPCs

Proliferation of uninfected and infected undifferentiated NPCs treated with resveratrol (0.1 to 10 μM) were evaluated by cell cycle measurements using propidium iodide (PI) as described previously [18]. After a 24-h treatment, cells were resuspended in PBS, fixed with 70% ethanol, labeled with PI (0.05 mg/ml), incubated at room temperature in the dark for 30 min, and filtered through 41-μm spectra/mesh nylon filters (Spectrum, Rancho Dominguez,

CA). DNA content was then analyzed using flow cytometer (BD FACSCalibur; BD biosciences). Obtained data were analyzed using the FlowJo V10 software (Ashland, OR) and expressed as count cells (% of control).

After the indicated treatments, cellular viability of NPCs was analyzed by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) method [19]. NPCs were incubated with 5 mg/mL of MTT for additional 2 h at 37°C under 5% CO₂ and 95% air. Dimethylsulfoxide was used to extract MTT formazan, and absorbances of each well at 490 nm were read in an automatic microplate reader. Results were expressed in percentages of control groups.

2.5 Neurosphere differentiation

For neural differentiation, neurospheres were plated into adherent poly-L-lysine- and laminin and cultured without growth factors in the absence or presence of RSV (0.1 to 10 µM). Migration rates were determined on the seventh days of differentiation as the distance of the foremost cells to the neurosphere analyzed by differential interference contrast microscopy [20, 21]. The radial migration was measured using ImageJ software, and data were reported as percentage of migration compared to untreated controls.

2.4 Immunocytochemistry

For immunocytochemistry analysis neurospheres were fixed in 4% of paraformaldehyde (PFA) for 20 min at 37°C, and permeabilized for 20 min with PBS plus 3% FBS and 0.1% Triton X-100 [22]. After 2 h of incubation with rabbit anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) antibodies (1:500; DAKO Systems, Carpinteria, CA), followed by mouse anti-β3-tubulin antibodies (1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and counterstained with 40,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI) solution (0.3 µg/mL; Sigma- Aldrich). In the same solution,

NPCs were washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature (RT) with secondary Alexa Fluor 488 or 555 (1:1,000; Life Technologies) antibodies. Coverslips were mounted, and slides were analyzed under a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Germany). Images were collected with a 453 objective lens (Zeiss).

2.5 Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry experiments were performed as described previously by researchers [21, 23]. Differentiated cells were dissociated and fixed for 20 min in ice-cold 14% PFA in PBS, washed with PBS supplemented with 2% FBS, and incubated for 30 min with primary anti-Nestin (1:500; Sigma-Aldrich), anti-GFAP (1:500; DAKO Systems, Carpinteria, CA), anti- β 3-tubulin (1:500; Sigma- Aldrich), or rabbit anti-microtubule associated protein-2 (MAP2, 1:500; Sigma-Aldrich) antibodies. Following a washing step with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 488- or 555-conjugated secondary antibodies (1:500) (Life Technologies) and analyzed by flow cytometer (BD Accuri; Becton & Dickinson Biosciences). Thirty-thousand events were acquired per samples. Forward and side light-scatter signals were used to exclude dead cells and debris. Data were analyzed using theFlowJo V10 software (FlowJo, Ashland, OR). Further details are provided in Supporting Information according to MIFlowCyt.

2.6 DNA extraction and Reaction of Polymerase Chain (PCR) detection

Adult brain and telencephalon of embryos from infected mice samples frozen at -80°C were processed following the protocol described by Sambrook et al. [24] with modifications. The tissue was incubated with 20 μL of proteinase K (20 mg/mL), overnight at 37°C . After this period, 500 μL of phenol-chloroform (1:1) was added and mixed, followed by centrifugation at 12.000 g for 10 minutes. The aqueous phase was transferred to same volume of absolute

isopropanol. The mixture was precipitate overnight, and centrifuged at 12.000 g for 30 min. Pellet re-suspend in 1 mL of cold ethanol 70%, followed by centrifugation at 12.000g for 10 min. Re-suspended in 30µL de TE (10 mMTris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA pH 8.0) and incubated at 56°C for 10 min, followed by a last centrifugation for final storage at -20°C.

PCR was carried out in order to determine the presence of *T. gondii* DNA using the gene target B1, the forward primer: 5'AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA-3' and reverse primer: 5'TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT-3' for amplification of a 500bp fragment as described [25]. The reaction was performed at a final volume of 25 µL containing 50ng of DNA template, 6 µM of each primers, 100 µM of dNTPs (Life Technologies), 2 mM MgCl₂, 2.5U Taq DNA polymerase (Life Technologies) and 2.5µL of enzyme buffer. PCR products were subjected to electrophoresis and visualized by staining with 2% ethidium bromide.

2.5. Statistical analysis

Results are expressed as mean values ± standard error of mean (SEM) representative for at least three independent experiments. Statistical analysis was assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test using GraphPad Prism (Version 5.0) software. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1 Congenital transmission of *T. gondii*

Qualitative DNA analysis was performed in brain of adult mice (n=5) and telencephalon of embryos from infected mice (n=5) in order to confirm congenital transmission of *T. gondii* by polymerase chain reaction (PCR). A specific band (529 bp) was observed in adult brain and

embryos indicating congenital transmission, as confirmed with a positive control (cistogenic strain VEG) (Fig. 1).

3.2 Stimulatory effects of resveratrol during neurosphere growing

NPCs isolated from telencephalon embryonic day-13 (ED-13) gave clonal expansion to neurospheres in serum free neurobasal medium supplemented with growth factors. We first studied RSV concentration dependency effects modifies the growing of neurospheres and *T. gondii* effects into NPCs culture (Fig. 2A). Lower concentrations of RSV (1 μ M and 10 μ M) led to increase in the number of neurospheres formed by uninfected NPCs after 5 days of exposure, whereas higher doses (100 μ M) inhibited neurosphere growth (Fig. 2B).

To confirm the effects of RSV and parasite influence during neurosphere formation, sizes of neurospheres were analyzed with ImageJ software (Fig. 2C). RSV (10 μ M) significantly increased sizes of uninfected neurospheres when compared to controls (Fig. 2D). Surprisingly, *T. gondii* infection also increased sizes of neurospheres when compared to control ($p < 0.05$). RSV at 1 μ M and 10 μ M concentration enhanced the parasite-induced effect in a dose-dependent manner (Fig. 2D).

3.3 Resveratrol increased proliferation and cellular viability of infected NPCs

Cell cycle measurements were conducted for further studying effects on proliferation (Fig. 3A). After 5 days of culture, *T. gondii* increased G0/G1 phase and reduce S and G2/M phases of the cell cycle in comparison to control ($p < 0.05$) (Fig. 3B). The treatment with RSV increased all phases of cell cycle in infected NPCs when compared to infect NPCs. Infected and treated NPCs elongated all cell cycle phases during toxoplasmosis infection.

NPC viability is shown in figure 3B. *T. gondii* induced apoptosis of neurospheres at a rate of of 80% when compared to controls ($p < 0.05$). Treatment with RSV at 1 and 10 μ M

concentration significantly prevented cellular death of uninfected NPCs (by 10 and 20%, respectively) when compared to controls (Fig. 3B) in a *per se* effect. Furthermore, both analyzed concentrations of RSV augmented viability of infected NPCs by around 80% cellular when compared to infected cells.

3.4 Resveratrol promoted migration of infected NPCs during brain development

NPCs present a radial migration pattern. Figure 4 shows representative images of uninfected and infected differentiated neurospheres, cultured in the presence or absence of resveratrol (0.1-10 μ M). The region enclosed between the dotted lines comprises 95% of migrating cells. *T. gondii* stimulated migration of infected NPCs after 7 days of differentiation when compared to control experiments (Fig. 4A). Treatment with RSV restored radial migration in infected NPCs similar to that observed with control cells ($p < 0.05$) (Fig. 4B).

3.5 *T. gondii* infection stimulated gliogenesis in infected NPC

We first determined the most effective concentration of RSV in promoting proliferation and migration of NPCs. To confirm the cellular differentiation, marker expression for NPCs, glial and neurons were studied by immunocytochemistry (Fig. 5). The images indicate an increase in GFAP-immunostaining of infected NPCs compared to control cells (Fig. 5A). NPC immunostaining for β 3-tubulin demonstrated that neuronal differentiation was not affected by *T. gondii* infection or RSV treatment; in other words, there were not any effects on neurogenesis (Fig. 5B). However, during *T. gondii* infection, frequencies of GFAP⁺ cells were augmented when compared to uninfected control cells ($p < 0.05$). Treatment with RSV at 1 μ M and 10 μ M revealed an important role of the molecule in neural fate determination by favoring gliogenesis over neurogenesis in infected NPCs (Fig. 5C).

3.6 Resveratrol enhanced neural maturation of infected NPC

Analysis by cytometry confirmed the difference in the expression anti-nestin (NPCs marker), anti-GFAP (glial marker), anti- β 3-tubulin (immature neurons marker) and anti-MAP2 (mature neurons marker) (Fig. 6). An increase of NPCs proliferation was observed in infected NPCs when compared to control using anti-nestin marker (Fig. 6A). RSV (0.1 to 10 μ M) increase nestin⁺cells. Treatment with RSV (1 and 10 μ M) in infected NPCs stimulated proliferation of NPCs during *T. gondii* infection.

GFAP marker analyzed the percentage of glial cells. The *T. gondii* increase GFAP⁺ cells when compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 6B). The exposition of RSV (0.1 to 10 μ M) significantly increase GFAP⁺ cells in *per se* effect when compared to control. However, 1 μ M RSV was able to restore glial expression in infected NPCs (Fig. 6B). No significant differences were observed on expression of the neural marker β 3-tubulin between groups ($p > 0.05$) (Fig. 6C). In addition, immunocytochemistry analysis suggested an increase in gliogenesis (GFAP⁺ cells) over neurogenesis (β 3-tubulin⁻ cells).

Beside *T. gondii* and RSV have not any influence on neural fate determination, we decide investigate another neural marker. The diferenciad neurospheres were incubated with anti-MAP2 (mature neuron-specific marker) to evaluate whether *T. gondii* and the treatment can influence neural maturation. The results showed a decrease of MAP2⁺ cells in infected NPCs when compared to control (Fig. 6D). The lower doses of RSV (0.1 μ M and 1 μ M) increased the percentage of MAP2⁺ cells. However, the *T. gondii* negatively decrease MAP2 marker when compared to control ($p < 0.05$). The treatment with RSV (0.1 to 10 μ M) stimulate neural maturation in infected NPCs. These results indicate that the concentration used in this study promotes neural maturation during *T. gondii* infection in NPCs.

4. Discussion

The CNS plays a central role in the lifelong persistence of *T. gondii* as well as in the pathogenesis of congenital toxoplasmosis. This study investigated the effects of resveratrol on modulation of neurogenesis in infected NPCs. Our first experimental strategy was to mimic an infection of the female aiming *T. gondii* vertical transmission through ingestion of cysts of the VEG cistogenic strain. The PCR analysis showed presence of *T. gondii* DNA in brain of female adult mice and telencephalon of infected embryos confirming vertical transmission (Fig. 1). These data support the severity of toxoplasmosis infection and are in accordance with previous results [26], which indicated a high congenital transmission rate (90%) in the mouse model.

T. gondii is capable of invading almost any nucleated cells [27]. Thus, NPCs are presumably one of these, and are crucial for the process of brain development. Considering that NPCs originate in CNS, we hypothesize that *T. gondii* on the NPCs may play an important role in the determination of cell fate in the process of neural differentiation. Congenital toxoplasmosis, especially in the first trimester of pregnancy, may result in severe brain changes in the newborn. The first evidence observed in this study was a high spontaneous abortion rate in infected female mice. Three of eight infected animals underwent spontaneous abortion or decreases in embryo size and numbers (data not showed).

The parasite may promote or inhibit the cell apoptotic machinery, depending on the host cell type, infection stage as well as on its virulence and parasite load [28]. Our results suggest that *T. gondii* caused an expansion of neurosphere growth, but not an increase in neurosphere number. Our hypothesis is that the major host tissue cells could act as the bystanders in chronic infection, and normal number cells may result from the secretion of cytokines by parasite-infected cells [29, 30].

Resveratrol has protective effects against many diseases, including toxoplasmosis [15]. In the present study, we evaluated the effects of RSV on growing, proliferation and survival of NPCs from uninfected and infected neurospheres. Among the concentration tested, 1 and 10 μM of RSV were the most effective in stimulating NPCs growing (Fig. 2A). By the other hand, the RSV inhibits neurosphere growing when administered in high dose (100 μM) in the culture (Fig. 2B); this clearly indicates that RSV at a high dose/concentration has a strong pro-apoptotic effect. According to literature, the RSV exerce biphasic effects on NPCs [31]; low concentrations (<10 μM) stimulated cell proliferation, whereas high concentrations (>20 μM) exhibited inhibitory effects. Our findings are consistent with evidence that RSV can increase numbers and sizes of neurospheres; consistent with the possibility that RSV crosses the blood-brain barrier and acts directly on proliferation of cells [16].

To confirm the effect of RSV on infected NPCs, cell cycle phases were analyzed. *T. gondii* arrested G0/G1 and decreased S and G2/M phases of cycle (Fig.3A). During neurogenesis a heterogeneous population of NPCs, neurons and glial cells are proliferating and dividing. Thus, when there are change during embryonic development and/or neural tube formation, the cell cycle extends. Notably, this increase in cell cycle length, due to the elongation of the G1 phase by the influence of *T. gondii*, may potentiate the fate of the neural cells. The treatment with RSV modify G0/G1 phase of cell cycle in uninfected NPCs probably exerts a symmetric or proliferative division resulting in a rapid expansion of NPCs. On the other hand, infected NPC arrest in G0/G1 phase shows that neurogenesis may be influenced by the treatment (Fig. 3A). RSV operated as stimuli to infected NPCs during S and G2/M phases, probably improving DNA sinthesis and acting on the checkpoint in the final step of G2, to cease the cycle if the DNA is damaged or if DNA replication has been incomplete. Previous results have reported that RSV arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition [32] as observed here.

The cellular viability of undifferentiated NPCs are extremely affected by *T. gondii* (Fig. 3B). The data shows an apoptotic effect of parasite in infected NPCs. Our results are in accordance with other research [33], which showed that the proliferation level was lower in infection groups than that of the controls, as determined by the MTT method. According to researchers, *T. gondii* induced apoptosis of NSCs through the ERS signal pathway via activation of CHOP, caspase-12 and JNK [7], which may constitute a potential molecular mechanism responsible for the cognitive disturbance in neurological disorders of *T. gondii*. The treatment with RSV restored cellular viability of infected NPCs. This was probably due to reducing the production of prostaglandins and the formation of ROS in lipopolysaccharide (LPS)-activated microglial cells [12]. Moreover, RSV was reported to suppress the activity of T and B-cells and macrophages [34].

The transition from neuroepithelial cells to the radial glia during embryonic development is being associated with the cell cycle. To gain insights into the biological effects of RSV on neurogenesis, we examined its influence on neural migration. Our data reveal that RSV (0.1 to 10 μ M) enhanced neural migration of uninfected NPCs (Fig. 4A). However, *T. gondii* infection seems to improve neural migration (Fig. 4B). These results suggest that alteration of migration may also influence neurogenesis and gliogenesis networks.

In *T. gondii* infection, NPCs migrate from the base during the G1 phase of the cell cycle, reach the apex during the S phase (low extension phase) and return to the base of the neural tube during the G2 phase of mitosis (low extension). However, the treatment with RSV (0.1-10 μ M) decreased neural migration in infected NPCs, playing a key role in the neural differentiation of cells. Specifically, a reduction in accuracy of spindle positioning relative to the apical-basal axis of neuroepithelial cells may be sufficient to result in cleavages other than the symmetric pattern. These interkinetic motions and symmetric divisions characterize the

early stages of central nervous system expansion, increasing the number of cells [35], as observed here.

The progress of neural differentiation is closely related to cell migration and neuron-glia interactions [36]. Progresses in neural and glial differentiation of NPCs were evaluated using anti-GFAP (Fig. 5A) and anti- β 3-tubulin (Fig. 5B) antibodies in immunofluorescence studies. The results revealed that *T. gondii* favored gliogenesis over neurogenesis in neurotoxoplasmosis.

Quantification of nestin (NPC⁺), GFAP⁺ cells and β 3-tubulin⁺ cells by flow cytometry showed that *T. gondii* significantly increased nestin⁺ and GFAP⁺ cells when compared to control (Fig. 6A, B). These results indicate, for the first time, an important role of *T. gondii* in indirectly increasing NPCs proliferation and glial fate determination.

Neurospheres were exposed to different concentrations of RSV (1–10 μ M), the results indicate that intermediary concentrations of RSV (1 and 10 μ M) exposure resulted in an increase of NPC expressed in uninfected NPCs. The results are consistent with literature [16], which show differential actions of RSV on proliferation of neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis.

In the range of tested concentrations, 1 μ M RSV seemed to be most effective in reducing glial cell production induced by *T. gondii*. Microglial cells are considered immune cells of the CNS. When stimulated, microglial cells react and produce inflammatory mediators. These molecules contribute to the dysfunction of the neural network in the CNS. Evidence supporting the involvement of inflammatory mediators in neurodegeneration is well documented with microglia playing a key role [28, 30]. Thus, the development of compounds modulating microglial activation has been suggested as one of the potential strategies for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases.

T. gondii displayed a differential invasive and developmental preference in neurogliogenesis during the course of infection [8]. Several studies have highlighted the ability of the parasite to infect a large number of glia cells during the acute phase, in contrast to the low numbers of infected neurons [37, 38]. However, studies showed that *T. gondii* infects and encysts in both astrocytes and neurons [39, 40].

In addition, we also carried out immunostaining studies to investigate the frequency of β 3-tubulin⁺ cells in neurospheres following the exposure of RSV. Quantitative analysis of anti- β 3-tubulin by flow cytometry did not reveal any differences of expression in uninfected and infected NPCs exposed to RSV (Fig. 6C). β 3-tubulin expression was not evident in neurospheres treated with RSV during *T. gondii* infection.

While here no significant differences were observed in percentages of immature neurons (β 3-tubulin⁺ cells), a reduction in the frequency of MAP2⁺ cells (mature neurons) occurred in differentiated cultures of infected NPCs (Fig. 5D). MAP-2 is a neuron-specific cytoskeletal protein that is used as a marker of neuronal phenotypes. Expression is weak in neuronal precursors, but becomes pronounced later (approximately one day after expression of neuron-specific tubulin isoform β 3) [41]. Our findings are in accordance with the work of Creuzet et al. [37], in which quantitative *in vitro* analyses with a RH strain of *T. gondii* revealed that approximately 10% of neurons and astrocytes were infected, while 30% of the microglial cells harbored intracellular parasites [42]. One possibility is that both astrocytes and neurons are infected *in vivo*, but only infected astrocytes either kill or are killed by the parasite, in other words less mature neurons.

Neural replication occurs only in distinct regions of the brain and in limited amounts [43]. While microglia and infiltrating macrophages are essential for controlling *T. gondii* infection in the brain, neurons and astrocytes are the parenchymal cells that have been most implicated in playing a role in CNS toxoplasmosis. Consequently, for the correct adjustment of

cells and cell differentiation in the embryonic stage of the CNS sufficient number of cells, predominates in the early stages, this implies that there is a greater probability in generating differentiated cells that will favor the production of astrocytes or glial cells neurons. On the other hand, RSV contributed to neural differentiation of NPCs, favoring their proliferation, migration, gliogenesis and neural maturation.

Our study provides some initial clues regarding the potential effects of RSV during neurogliogenesis in infected NPCs. Our data suggest that the inhibitory effect of RSV on infected NPCs is mediated by a decrease glial differentiation during chronic infection by *T. gondii*. Neurogenesis was severely affected by the parasite during brain development, resulting in increase of proliferation NPCs and neural maturation. By the other hand, the RSV promoted an increase in infected NPCs and restored neural determination during infection. Thus, we suggest the potential of RSV as a restorative therapy against toxoplasmosis brain disorders. Future studies of this striking form of effects on NPC plasticity will not only contribute to our understanding of the mechanisms and functional significance of neurogenesis in infected embryonic mammalian brain, but may also lead to novel strategies for therapy of neurological disease induced by *T. gondii*.

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

Financial support

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Project N°. 304328/2015-4), Brazil. MPP acknowledges postdoctoral fellowship support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Project N°. 2015/19478-3).

H.U. acknowledges grant support from FAPESP for investigating mechanisms of neurogenesis (Project N°. 2012/50880-4).

References

1. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, et al (2012) Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139:1375–1424
2. Vauloup-Fellous C, Bouthry E (2015) [Diagnosis of maternofetal infections]. *Presse Med* 44:621–30 . doi: 10.1016/j.lpm.2015.04.016
3. Vargas-Villavicencio JA, Besné-Mérida A, Correa D (2016) Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. *Vet. Parasitol.* 223:195–204
4. Elsheikha HM (2008) Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. *Public Health* 122:335–353 . doi: 10.1016/j.puhe.2007.08.009
5. Hampton, Marissa Martinez M (2015) Neonatal Network:NN; *New York* 34:274-278
6. McAuley JB (2014) Congenital toxoplasmosis. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3:30-35. doi: 10.1093/jpids/piu077
7. Wang T, Zhou J, Gan X, et al (2014) *Toxoplasma gondii* induce apoptosis of neural stem cells via endoplasmic reticulum stress pathway. *Parasitology* 141:988–995 . doi: 10.1017/S0031182014000183
8. Mendez OA, Koshy AA (2017) *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog.* 13
9. Koshy AA, Dietrich HK, Christian DA, et al (2012) *Toxoplasma* co-opts host cells it does not invade. *PLoS Pathog* 8:18 . doi: 10.1371/journal.ppat.1002825

10. Pangeni R, Sahni JK, Ali J, et al (2014) Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 11:1285–1298 . doi: 10.1517/17425247.2014.919253
11. Gülçin I (2010) Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov Food Sci Emerg Technol* 11:210–218 . doi: 10.1016/j.ifset.2009.07.002
12. Bastianetto S, Ménard C, Quirion R (2015) Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852:1195–1201
13. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010) Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. In: *Molecular Neurobiology*. pp 375–383
14. Pasinetti GM ari., Wang J, Ho L, et al (2015) Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochim Biophys Acta* 1852:1202–1208 . doi: 10.1016/j.bbadis.2014.10.006
15. Bottari NB, Baldissera MD, Tonin AA, et al (2015) Sulfamethoxazole-trimethoprim associated with resveratrol for the treatment of toxoplasmosis in mice: Influence on the activity of enzymes involved in brain neurotransmission. *Microb Pathog* 79:17–23 . doi: 10.1016/j.micpath.2015.01.001
16. Kumar V, Pandey A, Jahan S, et al (2016) Differential responses of Trans-Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. *Sci Rep* 6: . doi: 10.1038/srep28142
17. 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
18. William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G (2006) Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res* 26:2093–2099

19. William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G (2006) Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res* 26:2093–2099
20. Trujillo CA, Negraes PD, Schwindt TT, et al (2012) Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. *J Biol Chem* 287:44046–44061 . doi: 10.1074/jbc.M112.407197
21. Pillat MM, Cheffer A, de Andrade CM, et al (2015) Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: Consequence or cause of neuronal enrichment? *Cytom Part A* 87:929–935 . doi: 10.1002/cyto.a.22705
22. Negraes PD, Schwindt TT, Trujillo CA, Ulrich H (2012) Neural differentiation of P19 carcinoma cells and primary neurospheres: Cell morphology, proliferation, viability, and functionality. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 1: . doi: 10.1002/9780470151808.sc02d09s20
23. 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 . doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.08.019
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press
25. Yai LEO (2000) Avaliação da infecção experimental por *Toxoplasma gondii* em suínos pelas provas de bioensaio em camundongos e reação em cadeia de polimerase. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Aplicação as Zoonoses). Faculdade de Med. Veterinaria e Zootecnia.
26. Wang T, Liu M, Gao XJ, et al (2011) *Toxoplasma gondii*: The effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Exp Parasitol* 127:107–112 . doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.003

27. Dubey JP (2009) Toxoplasmosis of animals and humans. *Lancet* 363:1965–1976. doi: 10.1017/S0031182000078914
28. Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, et al (2013) *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp Parasitol* 134:256–265 . doi: 10.1016/j.exppara.2013.03.010
29. Mordue DG, Monroy F, La Regina M, et al (2001) Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. *J Immunol* 167:4574–4584 . doi: 10.4049/jimmunol.167.8.4574
30. Nishikawa Y, Kawase O, Vielemeyer O, et al (2007) *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: Role of nitric oxide and other soluble factors. *Parasite Immunol* 29:375–385 . doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00956.x
31. Leong C-W, Wong CH, Lao S-C, et al (2007) Effect of resveratrol on proliferation and differentiation of embryonic cardiomyoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 360:173–80 . doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.025
32. Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, et al (1998) Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* 250:53–58 . doi: 10.1006/bbrc.1998.9263
33. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010) Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. In: *Molecular Neurobiology*. pp 375–383
34. Kim YA, Kim G-Y, Park K-Y, Choi YH (2007) Resveratrol Inhibits Nitric Oxide and Prostaglandin E₂ Production by Lipopolysaccharide-Activated C6 Microglia. *J Med Food* 10:218–224 . doi: 10.1089/jmf.2006.143

35. Mora-Bermúdez F, Huttner WB (2015) Novel insights into mammalian embryonic neural stem cell division: focus on microtubules. *Mol Biol Cell* 26:4302–6 . doi: 10.1091/mbc.E15-03-0152
36. Gage FH, Temple S (2013) Neural stem cells: Generating and regenerating the brain. *Neuron* 80:588–601
37. Creuzet C, Robert F, Roisin MP, et al (1998) Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells. *Parasitol Res* 84:25–30 . doi: 10.1007/s004360050351
38. Cabral CM, Tuladhar S, Dietrich HK, et al (2016) Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 12: . doi: 10.1371/journal.ppat.1005447
39. Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, et al (1997) Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res* 83:637–641 . doi: 10.1007/s004360050311
40. Parlog A, Schlüter D, Dunay IR (2015) *Toxoplasma gondii* -induced neuronal alterations. *Parasite Immunol* 37:159–170 . doi: 10.1111/pim.12157
41. Izant JG, McIntosh JR (1980) Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4741–5 . doi: 10.1073/pnas.77.8.4741
42. Lüder CGK, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U (1999) *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: Differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol* 93:23–32 . doi: 10.1006/expr.1999.4421

43. Berenreiterová M, Flegr J, Kuběna AA, Němec P (2011) The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: Implications for the behavioral manipulation hypothesis. PLoS One 6: . doi: 10.1371/journal.pone.0028925

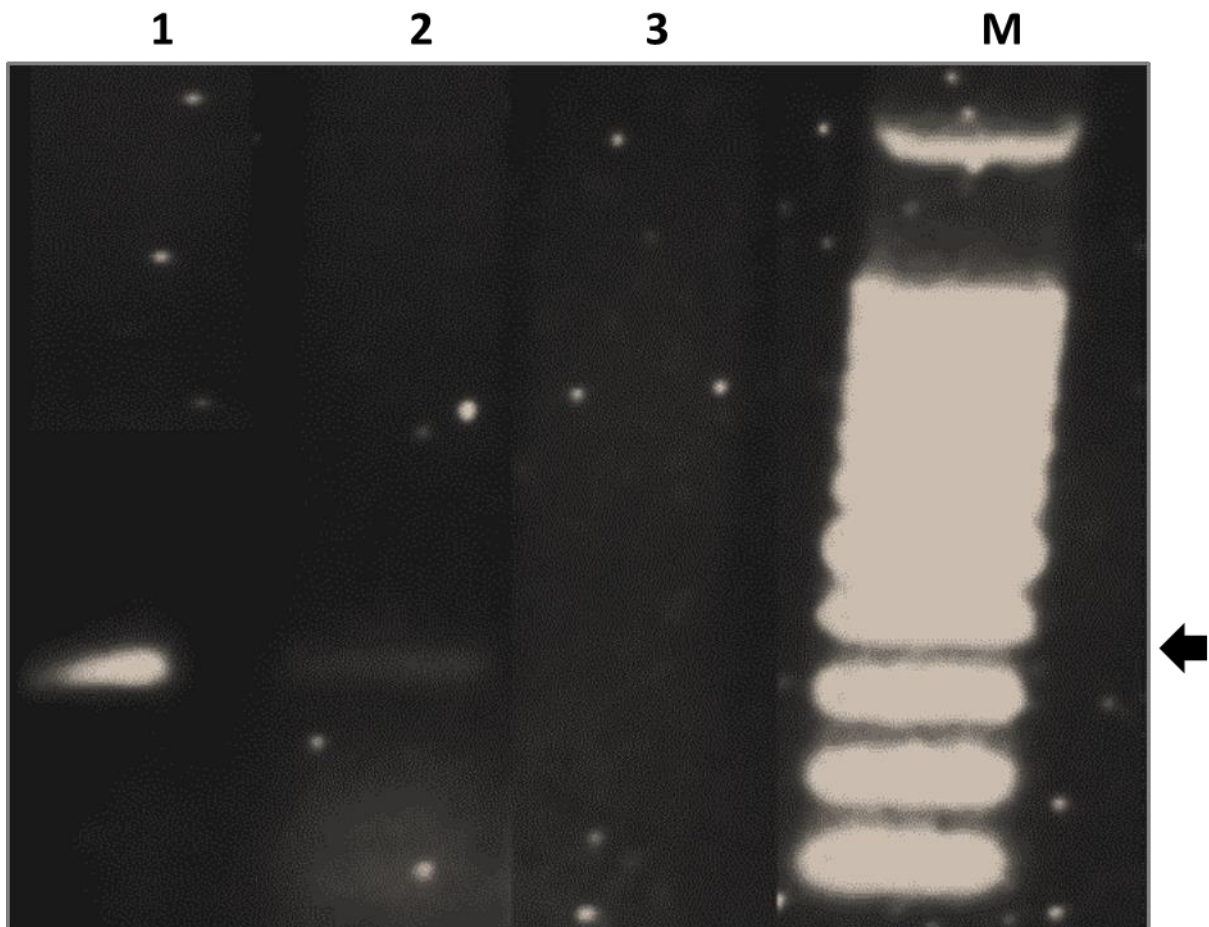
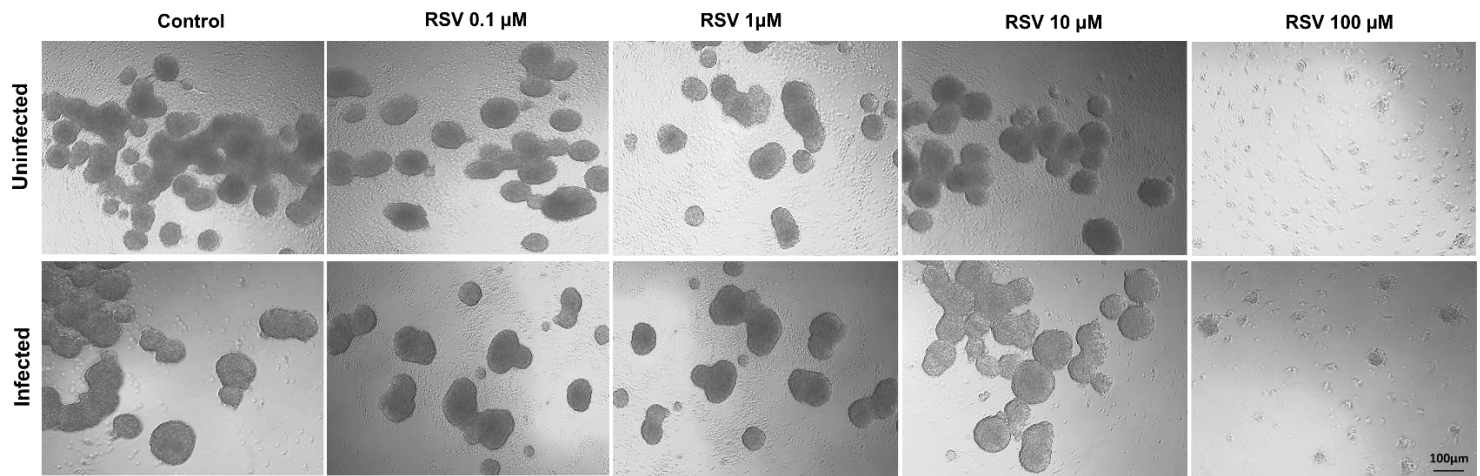
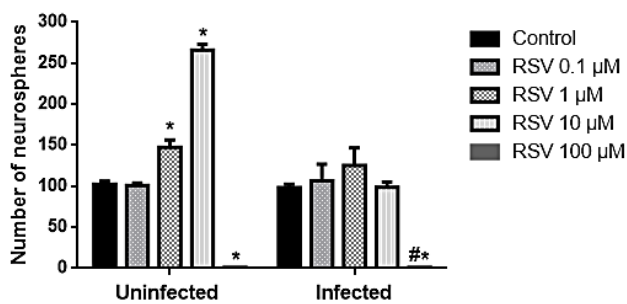


Figure 1- Maternal-fetal transmission of *T. gondii* consistent with congenital toxoplasmosis. 1: Specific band (\pm 529 bp, indicated by the arrow) of *T. gondii* DNA detected by qualitative PCR in the brain of infected female mice. **2:** *T. gondii* DNA in telencephalon of embryos (13 days). **3:** Negative control. Agarose gel (1.5%) stained with ethidium bromide showing specific amplicons.

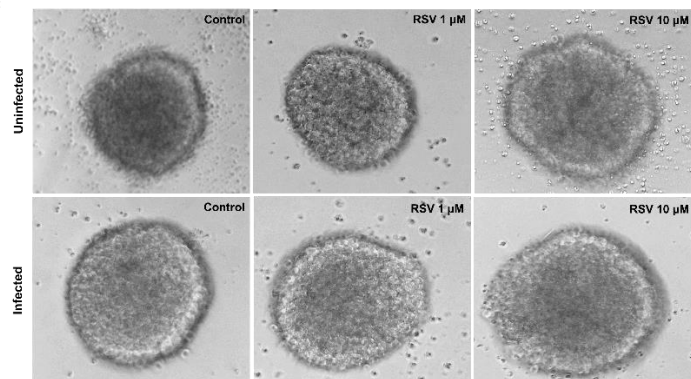
A



B



C



D

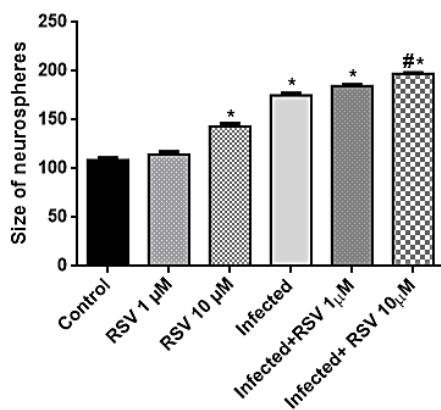


Figure 2- Effects of resveratrol on numbers and size of neurospheres. **A:** Uninfected and infected NPCs proliferate as neurospheres after 5 days of growing in presence or absence of RSV (0.1 to 100 μM). Scale bar: 100 μm . **B:** RSV treatment increased the numbers of neurosphere in uninfected NPCs. Neurosphere counts were performed using flow cytometry. **C:** Sizes of uninfected and infected neurosphere after treatment with RSV (1 and 10 μM). The sizes were determined with the ImageJ software. Data are expressed as mean values \pm SEM using Two-Way ANOVA with post-hoc Tukey tests within the GraphPad Prism software; significant differences $p < 0.05$. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups).

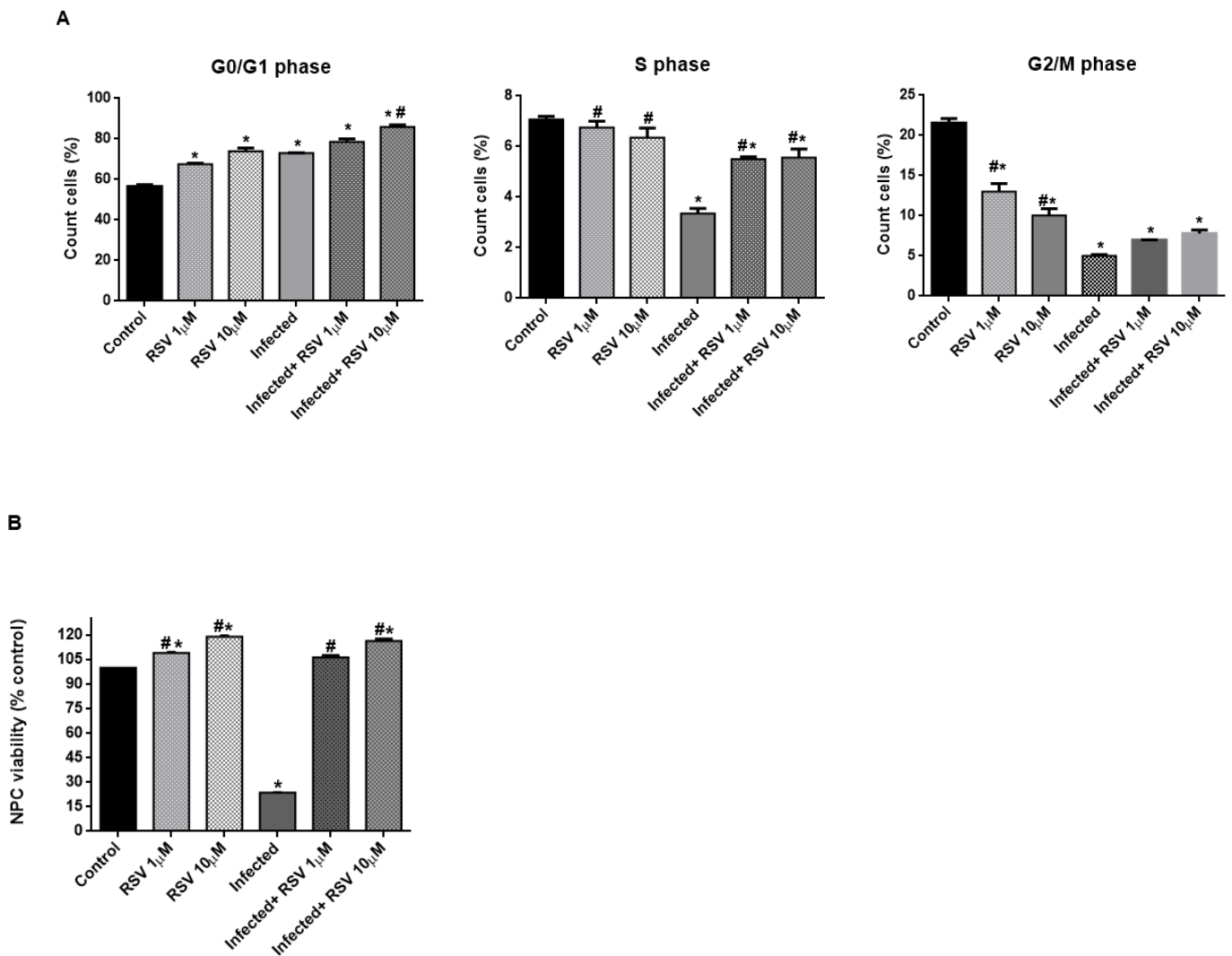


Figure 3- Resveratrol-induced increases on proliferation and viability of infected NPCs. A: Flow cytometry analysis of cells in G0/G1, S, G2/M phases of cell cycle of uninfected and infected treated with RSV (1 and 10 μ M). **B:** Percentages of differentiated cells in relation to control cells in the absence and presence of RSV (1 and 10 μ M). Data represent mean \pm SEM of three independent experiments using Two-Way ANOVA with the post-hoc Tukey test. * $p < 0.05$ (* Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

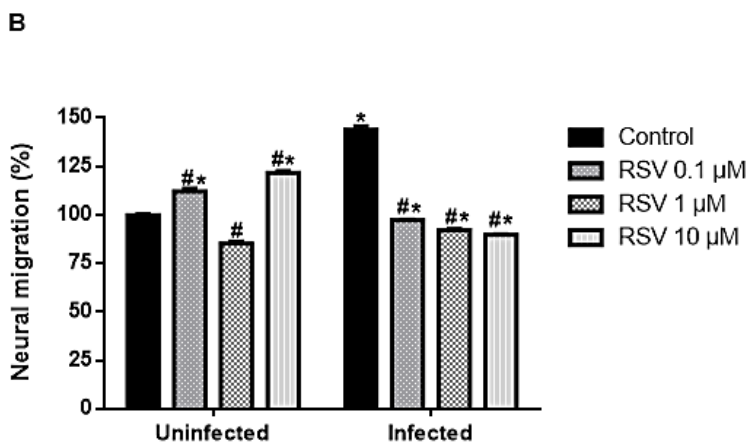
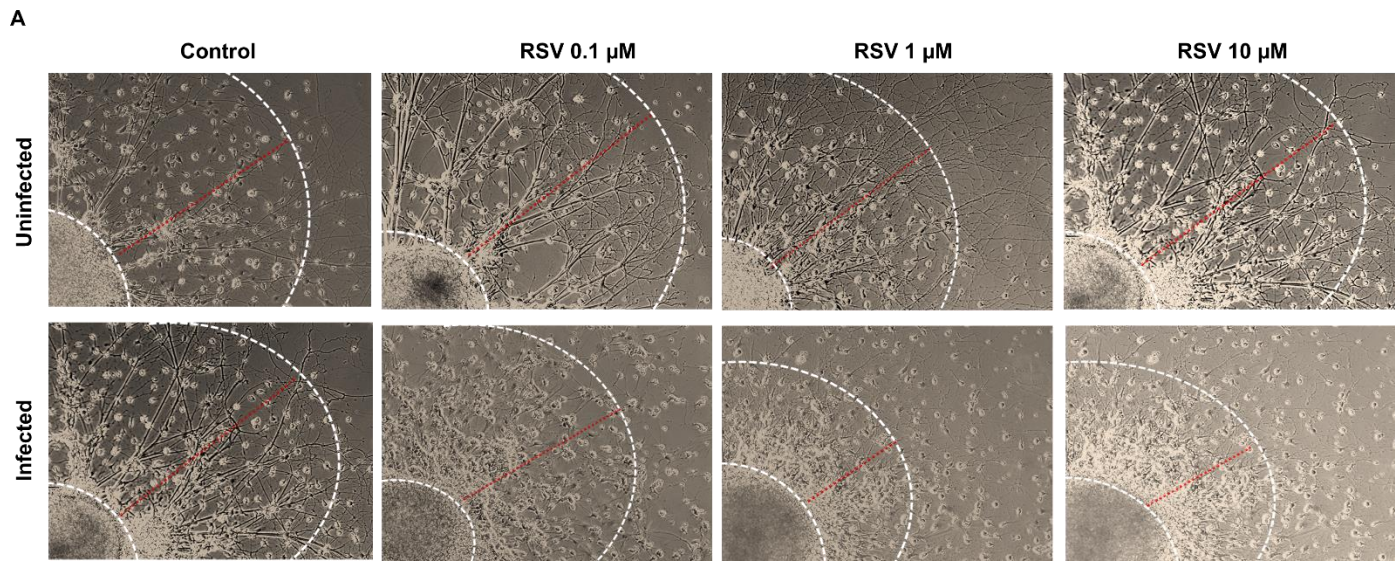


Figure 4- Resveratrol-induced decrease in radial migration of infected NPCs. **A:** Phase contrast images representing radial migration pattern after 7 days of neural differentiation in the presence or absence of RSV in uninfected and infected NPCs. The region comprised by the dotted lines corresponds to approximately 95% of migrating cells. **B:** Quantification of migration of uninfected and infected NPCs treated with RSV (0.1 to 10 μM). The quantification was done using ImageJ software and expressed as fold change. Significant results $p < 0.05$, using Two-Way ANOVA with the post-hoc Tukey test. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups).

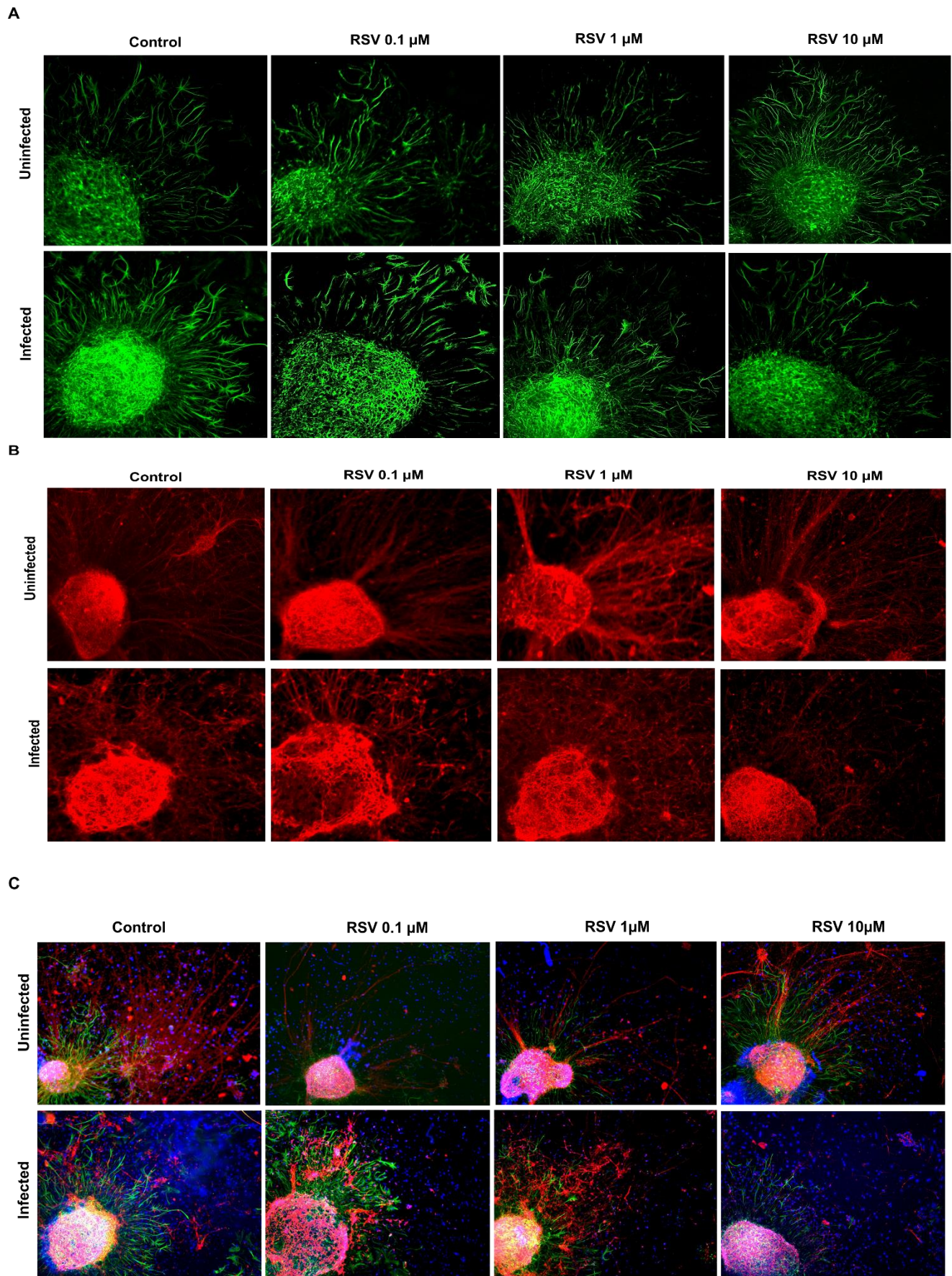


Figure 5- Neural progenitor differentiation induced by *T. gondii*. **A:** GFAP expression in neurospheres differentiated from uninfected and infected NPCs treated with RSV (0.1 to 10 μ M). **B:** β 3-tubulin marker in uninfected and infected NPCs treated with RSV (0.1 to 10 μ M). **C:** Typical immunofluorescence merges of neurospheres on day 7 of differentiation, showing glial GFAP) and neuronal β 3-tubulin expression.

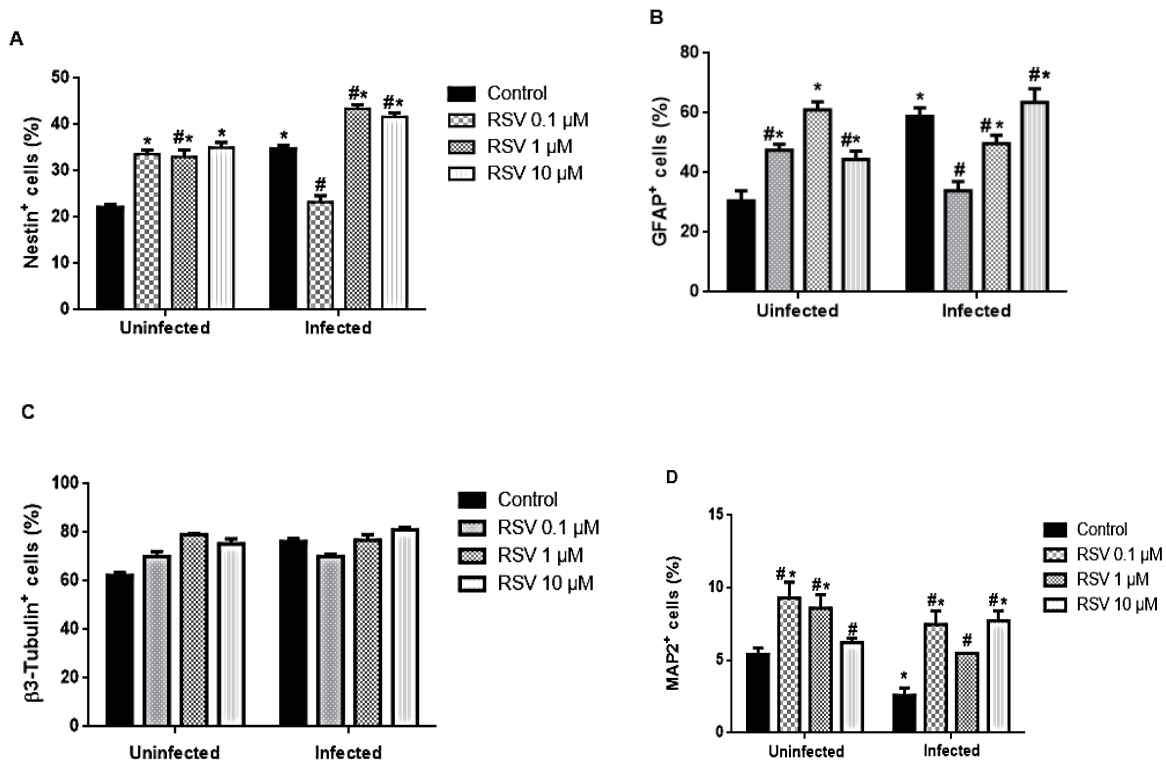


Figure 6- Resveratrol restored neurogenesis during *T. gondii* infection. Flow cytometry analysis using specific antibodies conjugated with Alexa Fluor (AF) 488 or AF 555 fluorophores in uninfected and infected NPCs treated with different concentrations of RSV (1 and 10 μ M). Percentages of **A:** NPCs (Nestin marker). **B:** Glial cell (GFAP⁺ cells). **C:** immature neurons (β 3-tubulin⁺ cells). **D:** Percentages of mature neurons (MAP2). The data represents mean values \pm SEM of three independent experiments. Significant results * p <0.05, using ANOVA-two way by GraphPad Prism. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups).

Manuscrito 1: Fase de revisão**Resveratrol-mediated reversal of changes in the purinergic signaling system and immune response caused by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells**

Dados sobre o periódico: Purinergic Signalling

Fator de Impacto: 3.19

Qualis Capes: B1



Resveratrol-mediated reversal of changes in the purinergic signalling system and immune response caused by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells

Nathieli B. Bottari^{a*}, Micheli M. Pillat^b, Maria R.C. Schetinger^a, Karine P. Reichert^a, Taís Vidal^a, Vanessa Machado^a, Charles E. Assman^a, Henning Ulrich^b, Anielen Dutra^a, Vera M. Morsch^a, Ivana B.M. Da Cruz^c, Cinthia Melazzo^a, Aleksandro Schafer Da Silva^{a,d*}

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

b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

c Graduate Program in Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

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

* Author for 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; nathieli_bb@hotmail.com).

Abstract

The effects of *Toxoplasma gondii* during embryonic development have not been explored despite the predilection of this parasite for the neurons and glial cells during parasite infection in the brain. Here, we investigated the activation of the purinergic system and proinflammatory responses during a congenital infection by *T. gondii*. Moreover, neuroprotective and neuromodulatory properties of resveratrol (RSV), a polyphenolic natural compound, were studied in infected neuronal progenitor cells (NPCs). For this study, NPCs were isolated from the telencephalon of infected mouse embryos and subjected to neurosphere culture in the presence of EGF and FGF2. *T. gondii* altered the course of neural differentiation by activating glial cells. ATP hydrolysis by NTPDase and adenosine deamination by ADA enzyme activities were altered in conditions of *T. gondii* infection. P2X7 and A_{2A} receptor expression rates were augmented in infected NPCs together with an increase of proinflammatory (INF- γ and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine gene expression. Our results confirm that RSV counteracted *T. gondii*-promoted effects on purinergic enzymes and also upregulated P2X7 and A_{2A} receptors modulating INF- γ , TNF- α and IL-10 cytokine production, which plays an integral role in the immune response to *T. gondii*.

Key-words: NPCs; P2X7 receptor; A_{2A} receptor; cytokines; toxoplasmosis.

1. Introduction

Inflammation plays an important role in a diversity of central nervous system diseases including toxoplasmosis disease. *Toxoplasma gondii* once into brain can use different mechanisms in order to subvert the immune response and enable the parasite to persist in the brain throughout the chronic phase of the disease, which can last for many years [1]. However, the emerging role of immunomodulatory mediators, and the potential use of their inhibitory effects for pathogen survival and replication in host cells, is still a new and poorly understood field.

Several studies have highlighted that *T. gondii* displays a exclusively preference for neurons, in contrast to the low numbers of infected microglial cells during chronic infection [2–4]. The effective control of parasite replication and disruption of the parasitophorous vacuole in host cells depends on immune response dependent of anti-inflammatory interleukine IL-10 accompanied by overproduction of proinflammatory cytokines IL-12, IFN- γ and TNF- α [5–7]. Furthermore, extracellular nucleotides adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) and nucleoside adenosine (ADO) as well as their receptors play an important role in the modulation of a variety of processes, including neuroinflammation [8].

Purinergic receptors when stimulated, promote suppression of proinflammatory cytokines and stimulate the immune response leading to the production of anti-inflammatory cytokines and protection from oxidative damage in infected cells [9, 10]. P2X7 and A_{2A} receptors, widely distributed in many cells of the central nervous system. Several studies have demonstrated that activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *T. gondii* [11]. A_{2A} may be an important stop signal to prevent excessive stimulation of inflammation, avoiding excessive cellular damage [12]. Some studies conducted by our research group have proposed the influence of infection by *T. gondii* on purine levels and ADA activity in the brain of mice

experimentally infected mice [13]. However, for the first time we determine here changes in NTPDase, 5'-nucleotidase activities and the P2X7 and A_{2A} receptors in neural precursor cells (NPCs), which had been experimentally infected with *T. gondii*. Some researchers have studied the expression of P2X receptors in immune cells in mice after *T. gondii* infection [14], showing that this receptor confers growth advantage for the control of immune response against *T. gondii*.

Given the potential damage if immune responses are left uncontrolled, it is probable that more than one immunomodulatory pathway has evolved. Understanding of these molecular mechanisms of immune response preconditioning regulation has become relevant. Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene), a non-flavonoid polyphenol, is naturally present at high concentrations in red wine and grape seeds, have been pharmacologically turned for therapeutic neuroimmunomodulation [15, 16], based on its antioxidant and anti-inflammatory activities [17]. RSV can attenuate activation of immune cells and the subsequent synthesis and release of proinflammatory mediators [18]. Current studies indicate that resveratrol (RSV) confer neuroprotection by inhibiting activation of microglia and reducing the production of proinflammatory factors through cellular cascade signaling pathways [19]. Our research group has proposed that RSV treatment modulates seric cytokine profiles and attenuates the tissue inflammatory process caused by *T. gondii* infection [20]. Therefore, in this study we investigated, whether activation of the purinergic system potentiates proinflammatory responses during congenital infection by *T. gondii*, and whether RSV exerts beneficial effects on the immune response. Thus, we investigated the activity of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine desaminase, P2X7 and A_{2A} purinergic receptor expression and the production of pro and anti-inflammatory cytokines in infected NPCs. Moreover, we provide evidence that RSV may exert a neuroprotective and neuromodulator effect in infected neuronal precursor cells.

2. Experimental procedures

2.1 Animals

All experiments were performed with ten Swiss female mice (up to 60 days weighing 25 ± 5 g). Animals were kept in boxes with five animals each, under a 12h light/dark cycle with controlled temperature and humidity (25°C, 70% respectively), respecting their circadian rhythm, and were fed with commercial feed and water *ad libitum*. All animals procedures were approved by the Ethics Committee on Animal of Universidade Federal de Santa Maria under protocol number 9509010915/15.

2.2 Parasite infection

For experimental infections, the animals were infected experimentally with *T. gondii* tachyzoites from VEG strain (type III, clonal lineage) orally to mimic a chronic infection. Twenty days post infection; the female mice were put for mating with male mice. Timed-pregnant animals were obtained by overnight mating and the efficiency of mating was confirmed by the presence of sperm after vaginal smear or appearance of the vaginal plug.

2.3 Isolation and Culture of Neural Progenitor Cells (NPCs)

The animals were euthanized using protocols reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, 9509010915/15). NPCs were isolated from the embryonic day-13 (ED-13) telencephalons of mice embryos according Hutton and Pevny [21].

Telencephalons were dissected under aseptic conditions and incubated with 0.1 % trypsin for 5 min at 37°C, fetal bovine serum (FBS) and for the inactivation trypsin. The cells were further mechanically dissociated. Then, cells were plated at a density of 2×10^5 cells/mL in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 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 2 (FGF 2) (both reagents from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and antibiotics (100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) and cultured at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% of CO₂. For neural differentiation, neurospheres were plated into adherent poly-L-lysine- and laminin-precoated cell-culture grade dishes and cultured in the presence of only 2% B-27 (Life Technologies).

2.4 Resveratrol

The treatment with resveratrol (RSV, C₁₄H₁₂O₃; molecular weight 228.25 g/mol; purity >98%, Sigma Aldrich) was diluted in PBS and added at 10µM final concentration to NPC cultures before and after NPC differentiation. The proposed concentration was based on a previous study reported by Kumar et al. [19], where 10 µM RSV showed beneficial effects on survival of NPC culture and describe by Bottari et al. [22], where 10µM was effective against *T. gondii* in culture of NPCs.

2.5 Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry experiments were performed as described previously [23]. Neurospheres were centrifuged for 5 min at 200xg and dissociated into a single cell suspension. Cells were fixed for 20 min in ice-cold 1% PFA in PBS, washed with PBS supplemented with 2% FBS. After 30 minutes of incubation with rabbit anti- glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:500; DAKO Systems, Carpinteria, CA), rabbit anti-P2X7 purinergic receptor (1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mouse anti-A_{2A} adenosine receptor antibodies (1:1000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). In the same solution, NPCs were washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature (RT) with secondary Alexa Fluor 488 or 555 (1:1000; Life Technologies) antibodies. Forty-thousand events were acquired per sample with fluorescence

measured in logarithmic scales. Forward and side light-scatter signals were used to exclude dead cells and debris. Data were analyzed using flow cytometer (BD FACSCalibur; BD biosciences) and FlowJo V10 software (Ashland, OR).

The S and G2/M phases of cell cycle were evaluated in undifferentiated NPCs treated with resveratrol 10 μM . After a 24-h 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- μm spectra/mesh nylon filters (Spectrum, Rancho Dominguez, CA) [24]. DNA content was then analyzed using flow cytometer (BD FACSCalibur; BD biosciences). The results were analyzed using the FlowJo V10 software (Ashland, OR) and expressed as count cells (% of control).

2.6 Enzymes assays

For enzymatic assays, undifferentiated neurospheres were centrifuged for 5 min at 200 \times g and dissociated into a single cell suspension with PBS 1X. Twenty microliters of cell suspension (0.9–1.0 mg/mL protein) was added to the reaction mixture of NTPDase (CD39) or 5' nucleotidase (CD73) and pre incubated for 10 min at 37°C, to a final volume of 200 μL . E-NTPDase activity was determined by the method of Lunkes et al. [25]. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of 1.0 mM. E-5' nucleotidase was determined by the method of Heymann et al. [26]. Phosphate released by ATP, ADP and AMP hydrolysis was measured using KH_2PO_4 as standard. Protein levels were measured according to Bradford [27]. Enzyme specific activities are reported as $\mu\text{mol Pi}$ released/min/mg of protein.

ADA activity were estimated in neurospheres spectrophotometrically by the method of Giusti and Galanti [28] based on the measurement of ammonia produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. For the assay 50 μL of cells suspension reacted with 21

mmol/L of adenosine, pH 6.5 was incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by adding a solution of 106.2 mM phenol and 167.8 mM sodium nitroprussiate and a hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measure at 620 nm and the results were express in units per liter (U/L).

2.7 Cytokine gene expression

In this study, qRT-PCR was employed to analyze gene expression modulation of inflammatory cytokines using a similar approach as previously described [29]. In brief, RNA was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen[™] Life Technologies, Carlsbad, CA) and quantified at 260 nm. Reverse transcription was performed with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and RNA was added to a final concentration of 1 µg/µL. The following steps were used for cDNA synthesis: 37°C for 5 min, heating at 65°C for 10 min and cooling for 10 min at 5°C. Additionally, incubation step at 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, 85°C for 5 min and a final incubation at 5°C for 60 min were used. The run was performed in a volume of 20 µL using 1x QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and 1 µL of cDNA. The reaction was performed in a Rotor-Gene Q (Qiagen) equipment under the following conditions: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 seconds, 60°C for 30 seconds followed by a melting curve of 65°C to 95°C. The following forward (5'-3') and reverse (3'-5') primer sequences were used for qRT-PCR: β-Act 5'CCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3', 3'AGGAGCCAGAGCAGTAATCT-5'; IL-1β 5'GGTACATCAGCACCTCACAA3', 3'TTAGAAACAGTCCAGCCCATAC-5'; IL-6 5'-CTCCATCCAGTTGCCTTCT-3', 3'CTCCGACTTGTGAAGTGGTATAG-5', INF-γ 5'-CTCTTCCTCATGGCTGTTTCT-3', 3'-TTCTTCCACATCTATGCCACTT-5'; TNF-α 5'-TTGCTCTGTGAAGGGAATGG-3', 3'-GCTCTGAGGAGTAGACAATAAAG-5'; IL-10 5'-ACAGCCGGGAAGACAATAAC-3', 3'-CAGCTGGTCCTTTGTTTGAAG-5'.

2.8 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard errors of mean (SEM) for the values obtained from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA using Tukey as post-hoc test by Graph Pad Prism (Version 5.0) software. The values * $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1 Resveratrol induce growing and proliferation of infected NPCs

First of all, effects of *T. gondii* parasite infection on NPC cultures were assessed. Undifferentiated NPCs morphology is shown in figure 1A. Proliferative cells developed small neurospheres by day 7 in serum free neurobasal medium supplemented with growth factors. Infected NPCs from embryonic day-13 (ED-13) fetus showed an increase in the size of neurospheres when compared to controls (Fig. 1B). Treatment with 10 μ M RSV increase the size of the neurospheres effect *per se*, while the treatment resulted in a significant increase of the size of infected NPC (Fig. 1B).

Moreover the materno fetal transmission of *T. gondii* stimulate gliogenesis in NPC of infected E-13 embryos (Fig. 1C). 10 μ M RSV treatment of differentiated NPC promoted a significant increase in glial differentiation ($p < 0.05$) (Fig. 1C).

To study potential alterations in the host cell during brain development, cell cycle phases were evaluated (Fig. 1D). *T. gondii* infection decrease (20%) proliferating cells in S and G2/M phases (Fig. 1E). The treatment with RSV in undifferentiated NPCs stimulates proliferation in *per se* effect (14%) and infected NPCs (2%) (Fig. 1E).

3.3 Resveratrol modulate purinergic enzymes of infected NPC

The capacity of the NPCs to hydrolyze extracellular ATP and ADP by NTPDase (CD39) and 5-nucleotidase (CD73) activities was evaluated in this study (Fig. 2). A decrease of ATP hydrolysis ($p < 0.05$), and an increase of ADP hydrolysis ($p < 0.05$) was observed in infected NPCs, when compared to control groups. No significant differences in AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase (CD73) could be detected ($p > 0.05$). Infected NPCs decreased adenosine hydrolysis (Fig. 2) by ADA, when compared to control ($p < 0.01$). ATP, ADP, AMP hydrolysis was slightly augmented by RVS as *per se* effects ($p > 0.05$). Furthermore, 10 μ M RSV restored ATP hydrolysis by NTPDase in infected NPCs.

3.4 Purine receptor expression are altered following *T. gondii* infection

Flow cytometry experiments clearly confirmed augmented P2X7 receptor expression of infected neurospheres (Fig. 3A). Exposure of NPCs to 10 μ M RSV did not alter expression of P2X7 receptors ($p > 0.05$). However, RSV attenuated the increments of P2X7 receptor protein in infected NPCs (Fig. 3B).

Further, increased of A_{2A}⁺ cells was shown for the infected group when compared to the control group ($p < 0.05$). While 10 μ M RSV did not affect A_{2A} receptor expression ($p > 0.05$). On the other hand, RSV augmented expression in infected NPCs (Fig. 3C).

3.5 Effects of RSV in cytokines gene expression in infected NPC

Proinflammatory cytokines play a crucial role in the immune response against *T. gondii*. In view of that, mRNA transcription levels of IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α , and anti-inflammatory IL-10 in infected and non-infected NPCs were determined in this study (Fig. 4). A marked increase in transcription levels of mRNA coding for IL-6 (Fig. 4B), INF- γ (Fig. 4C), TNF- α (Fig. 4D) and IL-1 (Fig. 4E) was observed for infected NPCs ($p > 0.05$) when compared to the

control group. Further, the treatment with 10 μ M RSV reduced INF- γ , TNF- α and IL-10 gene expression in infected NPCs.

4. Discussion

The induction of immunity after infection by *T. gondii* is a crucial step in establishing a balanced host–parasite relationship in the central nervous system (CNS). In this study, we investigated the involvement of the purinergic signaling during congenital infection by *T. gondii* and its relationship with the immune response. In view of the wide spectrum of biological activities of RSV, our hypothesis was whether treatment with RSV could modulate inflammatory responses in infected NPCs mediated by purinergic signalling.

After reaching the CNS, the parasite invade all nucleated cells and initiate activation of neurons and glial cells [3, 30-31]. Initial signs of glial activation were observed in NPCs from embryos infected following materno-fetal infection by *T. gondii*. Further, we shows that *T. gondii* induced increased neurosphere size (Fig.1A). According to Joseph and Hermanson [32], reported fine-tuned regulation of NPC proliferation and death is required to achieve the correct number of specific cell types, being a crucial component for regulating brain size during neurogenesis. Thus, the increased size NPCs proliferation can be a compensatory mechanism by *T. gondii* induced injury to increase proliferation and differentiation rates.

RSV treatment also increase neurospheres size promoting neurogliogenesis in infected NPC (Fig. 1B). It has been reported that larger and high proliferation neurospheres in the presence of 10 μ M RSV [19].

As a natural polyphenolic compound, RSV has attracted considerable interest regarding its anti-inflammatory and neuroprotective properties [33, 34]. These activities of RSV against neuroinflammation appear to stimulate glial differentiation (Fig. 1C). As the treatment with

RSV altered size and differentiation fate of infected neurospheres, effects of the compound on early stage and control of cell proliferation were determined.

Thus, all phases of cell cycle were evaluated by flow cytometry analysis using propidium iodide. According to our data, the infection by *T. gondii* results in dysregulation of the cell cycle inducing NPCs to remain in a quiescent state (G₀/G₁ phase) (Fig. 1D). Notably, the number of cells present in S and G₂/M was lower than those of infected cells (Fig. 1E). The ability of *T. gondii* to infect synchronized cell cultures increased cells proceeded from the G₁ to the S phase and decreased cells entered G₂/M was subject to previous studies [35, 36].

The present study was designed to examine the anti-inflammatory and neuroprotective effects of the RSV on NPCs under infection by *T. gondii*. Beneficial effects of RSV regulating extracellular ATP, ADP and ADO levels through NTPDase (ATP and ADP as substrate), 5'-NT (AMP as substrate) and ADA activities in infected NPCs (Fig. 2) point at an enhanced break-down of purinergic receptor agonists.

Based on E-NTPDase increased activity in infected NPCs, it is possible to suggest that high extracellular ATP levels activates P2X₇ receptor on the surfaces of microglia (Fig. 3A). The purinergic P2X₇ receptor is a bi-functional adenosine triphosphate (ATP) ion channel that contributes to the control of many physiological functions, including cell death, killing infectious organisms, and regulating inflammatory processes [9, 10] as well as for control of survival, mobilization and differentiation of neural stem cell. Continued activation of P2X₇ receptors by ATP during chronic infection have been proposed as a mechanism for elimination of *T. gondii* tachyzoites from infected macrophages [11].

Moreover, adenosine A_{2A} receptor expression was increased in infected NPCs (Fig. 3B). These protein-coupled receptors cause accumulation of intracellular cAMP, which has strong immunosuppressive effects [37-39]. It is quite possible that this pathway suppresses cell

responses upregulating intracellular cAMP levels and turn downregulating host immune response.

Therefore, ADO in high concentrations can act on A_{2A} receptors, attenuating inflammation and probably tissue damage, concomitantly with the downregulation supposedly provided by the enhanced activity of E-NTPDase found in our study. It was already reported that the infection by *T. gondii* causes a significant augmented in ADO levels in the brain of mice [13].

This purinergic receptors, when stimulated in *T.gondii*- activated microglia induce production of pro-inflammatory cytokines IL-6 (Fig. 4A), INF- γ (Fig. 4B) and TNF- α (Fig. 4C). The activation of microglia cells by *T. gondii* induced local immune responses as pathway to control congenital infection by *T. gondii* [40]. On the other hand, the host cells increase anti-inflammatory IL-10 cytokine (Fig.4E) to prevent neuroinflammation in infected NPCs.

The potential inhibitory effects of RSV on cytokine gene expression and its beneficial effects in protecting against neurotoxicity has been reported [41]. Our study clearly illustrated that 10 μ M RSV prevents from elevated mRNA INF- γ and TNF- α gene expression (Fig. 4C and Fig. 4D) through inhibition of P2X7 receptor expression in infected NPCs .

The immune response was regulated by RSV, once 10 μ M RSV decreased INF- γ (Fig. 4C) and TNF- α (Fig. 4D) cytokine expression in infected NPCs. Studies have reported that RSV has been shown to inhibit the production of TNF- α by LPS-activated microglia [18, 42]. It is clear that RSV exerts neuroprotection through inhibiting activation of microglia and the subsequent release of various proinflammatory factors. Furthermore, RSV decreasing IL-10 expression (Fig. 4D) in order to restore immune response against parasite.

Together, the data point activation of the P2X7 and A_{2A} receptors and showed an increase NTPDase activity in infected NPCs. Extracellular ATP contributes to local inflammation and modulates parasite intracelular elimination and decrease survival host cell as

observed. To summary the data suggested that P2X7 receptors contribute to *T. gondii* infection control through the stimulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines. Moreover this study benefit to understand the therapeutic mechanisms of RSV on purinergic sinaling and immune response during a congenital infection by *T. gondii*.

5. Conclusion

In summary, our study demonstrated the importance of purinerigic system signalling via P2X7 and A_{2A} receptors, as a component of the inflammatory response against *T. gondii*. Here we evaluate the effects of RSV as a neuroprotector and neuromodulator reporting a positive feedback mechanism mediated by RSV stimulating NTPDase and modulating P2X7 and A_{2A} receptors. We conclude that parasite elimination might occur following P2X7 receptor signalling, and suggest RSV as a novel therapy against *T. gondii* based inibition of parasite through immune response and purinerigic sinalling in infected NPCs.

Ethics Committee: This experiment was approved by the Ethics Committee on Animal of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), under protocol number 9509010915.

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

Financial support

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX, process number 23038.005848/2018-31). CAPES/PROEX - Project N°. 0737/2018. HU is grateful for grant support by the São Paulo State Foundation FAPESP (Project No. 2012/50880-4) and the National Research Council CNPq. MMP is grateful for a post-doctorate fellowship granted by FAPESP (Project No. 2015/19478-3).

References

1. Dubey JP, Jones JL (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38:1257–1278
2. Lüder CGK, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U (1999) *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: Differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol* 93:23–32 . doi: 10.1006/expr.1999.4421
3. Parlog A, Schlüter D, Dunay IR (2015) *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol.* 37:159–170
4. Cabral CM, Tuladhar S, Dietrich HK, Nguyen E, MacDonald WR, Trivedi T, et al (2016) Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 12(2): e1005447. doi:10.1371/journal.ppat.1005447
5. Chao CC, Hu SX, Gekker G, et al (1993) Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma-gondii* in microglial cells. *J Immunol* 150:3404–3410
6. Gaddi PJ, Yap GS (2007) Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol. Cell Biol.* 85:155–159
7. Yarovinsky F, Kanzler H, Hieny S, et al (2006) Toll-like Receptor Recognition Regulates Immunodominance in an Antimicrobial CD4+ T Cell Response. *Immunity* 25:655–664 . doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.015
8. Burnstock G, Boeynaems JM (2014) Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal.* 10:529–564
9. Coutinho-Silva R, Monteiro da Cruz C, Persechini PM, Ojcius DM (2007) The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. *Purinergic Signal.* 3:83–90
10. Coutinho-Silva R, Ojcius DM (2012) Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect* 14:1271–1277 . doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.009
11. Corrêa G, Marques da Silva C, de Abreu Moreira-Souza AC, et al (2010) Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect* 12:497–504 . doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.004
12. Thiel M, Caldwell CC, Sitkovsky MV (2003) The critical role of adenosine A_{2A} receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect* 5:515-526. doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00068-6

13. Tonin AA, Da Silva AS, Casali EA, et al (2014) Influence of infection by *Toxoplasma gondii* on purine levels and E-ADA activity in the brain of mice experimentally infected mice. *Exp Parasitol* 142:51–58. doi: 10.1016/j.exppara.2014.04.008
14. Corrêa G, Marques da Silva C, de Abreu Moreira-Souza AC, et al (2010) Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect* 12:497–504 . doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.004
15. Frémont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66:663–673. doi: 10.1089/152308601317203567
16. Burns J, Yokota T, Ashihara H, et al (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 50:3337–3340 . doi: 10.1021/jf0112973
17. Das S, Das DK (2007) Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6:168–73 . doi: 10.2174/187152807781696464
18. Meng XL, Yang JY, Chen GL, et al (2008) Effects of resveratrol and its derivatives on lipopolysaccharide-induced microglial activation and their structure-activity relationships. *Chem Biol Interact* 174:51–59. doi: 10.1016/j.cbi.2008.04.015
19. Kumar V, Pandey A, Jahan S, et al (2016) Differential responses of Trans-Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. *Sci Rep* 6: . doi: 10.1038/srep28142
20. Bottari NB, Baldissera MD, Tonin AA, et al (2015) Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim associated to resveratrol on its free form and complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on cytokines levels of mice infected by *Toxoplasma gondii*. *Microb Pathog* 87:40–44. doi: 10.1016/j.micpath.2015.07.013
21. Hutton SR, Pevny LH (2008) Isolation, culture, and differentiation of progenitor cells from the central nervous system. *Cold Spring Harb Protoc* 3: . doi: 10.1101/pdb.prot5077
22. Bottari NB, Schetinger MR, Pillat MM, et al. (2018) Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii*. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-018-1180-z
23. Pillat MM, Cheffer A, de Andrade CM, et al (2015) Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: Consequence or cause of neuronal enrichment? *Cytom Part A* 87:929–935. doi: 10.1002/cyto.a.22705
24. William-Falcao S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G (2006) Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res* 26:2093–2099
25. Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, et al (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 109:189–194 . doi: 10.1016/S0049-3848(03)00178-6

26. Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW (1984) Subcellular Localization of 5'-Nucleotidase in Rat Brain. *J Neurochem* 43:971–978 . doi: 10.1111/j.1471-4159.1984.tb12832.x
27. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254 . doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
28. Guist G., Galanti B (1984) Colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim 315–323
29. Schott KL, Assmann CE, Barbisan F, et al (2017) Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. *Chem Biol Interact* 273:18–27 . doi: 10.1016/j.cbi.2017.05.007
30. Mosmann T (1983) 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
31. Mendez OA, Koshy AA (2017) *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog*. 13
32. Joseph B, Hermanson O (2010) Molecular control of brain size: Regulators of neural stem cell life, death and beyond. *Exp. Cell Res*. 316:1415–1421
33. Bureau G, Longpré F, Martinoli MG (2008) Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res* 86:403–410 . doi: 10.1002/jnr.21503
34. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010) Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. In: *Molecular Neurobiology*. pp 375–383
35. Radke JR, Donald RG, Eibs A, et al (2006) Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog* 2:0964–0974 . doi: 10.1371/journal.ppat.0020105
36. Kumar V, Sharma A (2009) Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* 616:7–15
37. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413–492 . doi: 10.1007/978-3-642-28863-0_5
38. Fredholm BB, Cunha RA, Svenningsson P (2003) Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem* 3:413–426
39. Lappas CM, Rieger JM, Linden J (2005) A2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN-gamma Production in Murine CD4+ T Cells. *J Immunol* 174:1073–1080 . doi: 10.4049/jimmunol.174.2.1073

40. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, et al (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185:579–82 . doi: 10.1084/jem.185.3.579
41. Zhang F, Wang H, Wu Q, et al (2013) Resveratrol protects cortical neurons against microglia-mediated neuroinflammation. *Phyther Res* 27:344–349 . doi: 10.1002/ptr.4734
42. Bi XL, Yang JY, Dong YX, et al (2005) Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol* 5:185–193 . doi: 10.1016/j.intimp.2004.08.008

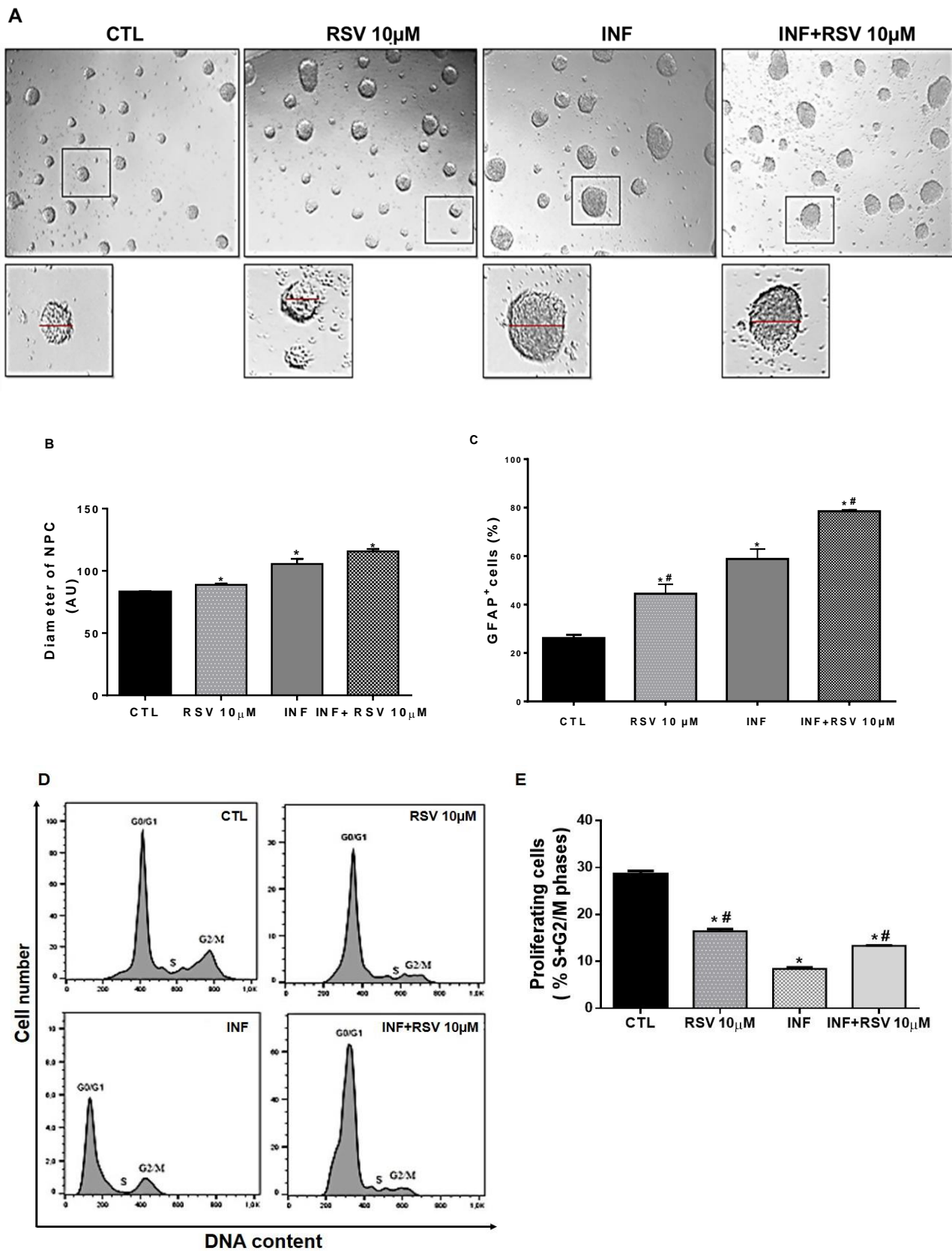


Fig.1- RSV-induced promotion of NPC growing and glial differentiation induced by *T. gondii* in NPCs. A: The images show NPC morphologies of control and infected, which had

been treated or not with RSV. Scale bars 100 μ m. **B:** Diameter of NPCs (AU). Image quantification was done using ImageJ software. * $p < 0.05$ (*Control vs infected group). **C:** Percentages of glial cells (GFAP⁺ cells) in control and infected neurospheres following RSV (10 μ M) treatment. **D:** Histograms showing cell cycle phases of infected NPC populations treated or not with 10 μ M RSV (1 μ M). **E:** Flow cytometry analysis of cells in S and G2/M phases of cell cycle of undifferentiated NPCs. 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).

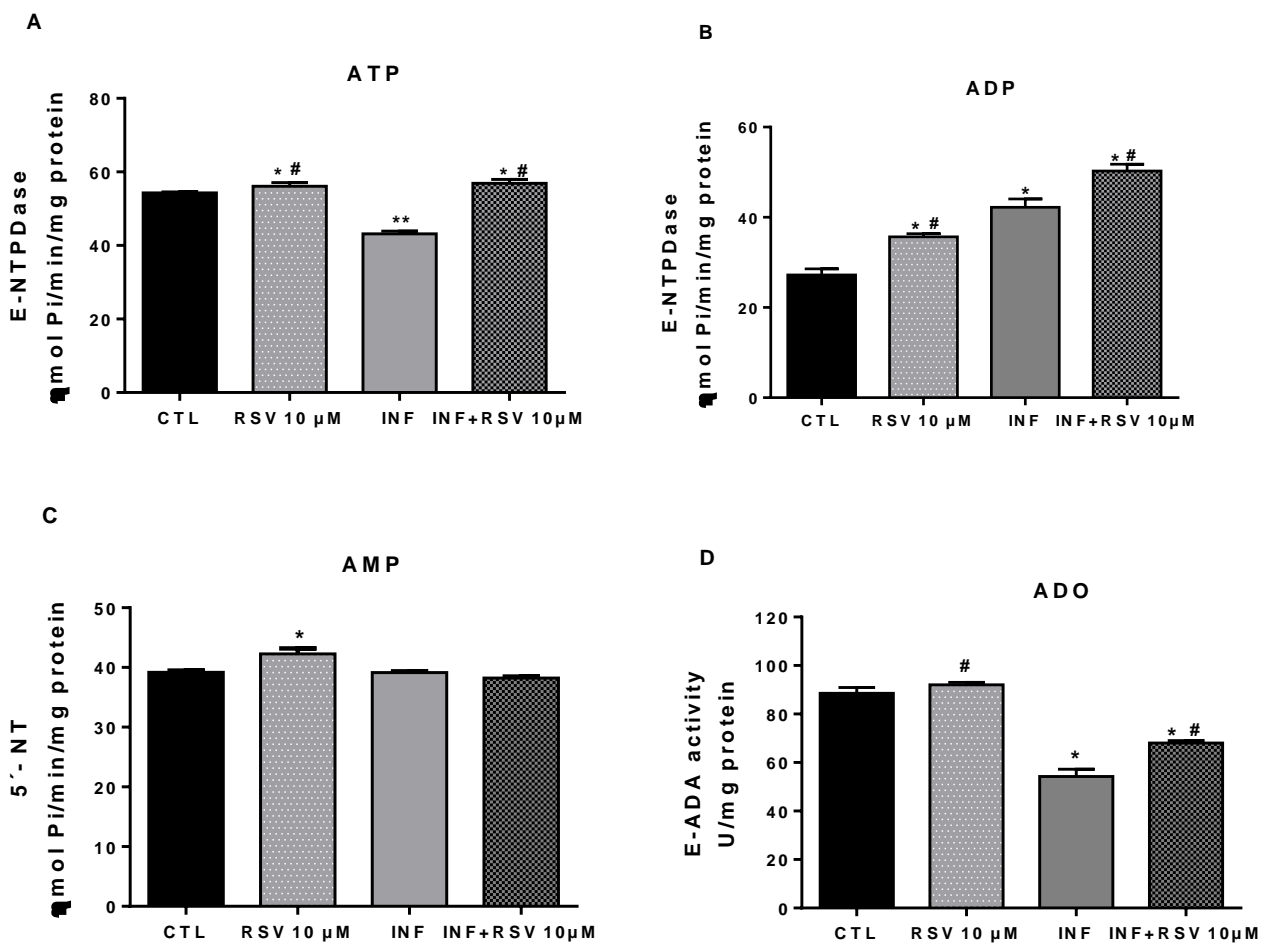


Fig. 2- Influence of *T. gondii* on NTPDase (hydrolyzing ATP and ADP), 5'-nucleotidase (hydrolyzing AMP) and ADA activities (hydrolyzing ADO) in control and infected differentiated neurospheres treated with RSV (10 μ M). The data represent mean \pm SEM of three independent experiments analyzed by One-Way ANOVA with the post-hoc Tukey test. * $p < 0.05$ (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

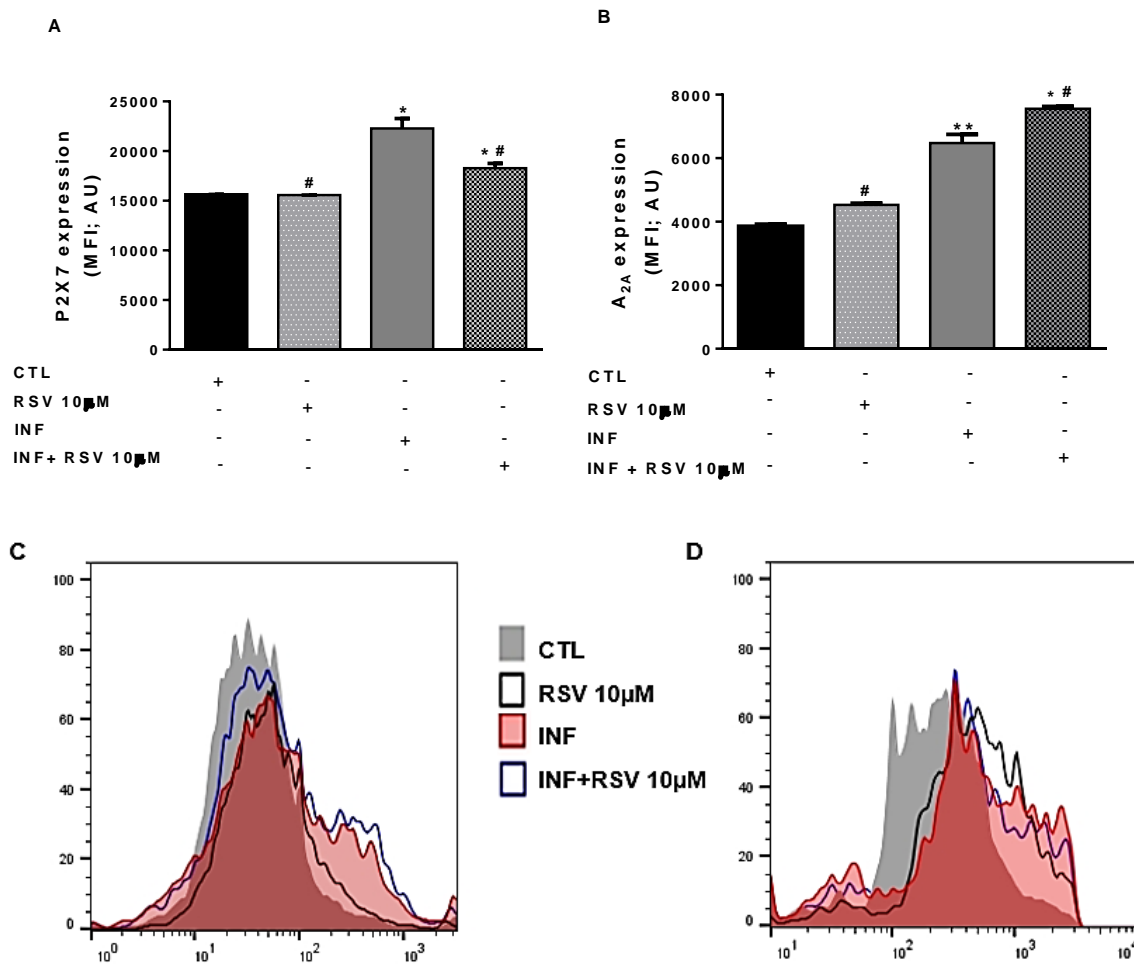


Fig. 3-Effects of RSV on purinergic receptors during immune responses developed by *T. gondii* in differentiated NPCs. A: P2X7 expression (MFI; AU) in control and infected neurospheres. **B:** A_{2A} expression (MFI; AU) in control and infected neurospheres treated with 10 μ M RSV. **C:** Representative histogram P2X7 receptor (MFI; AU). **D:** Representative histogram A_{2A} receptor (MFI; AU). The data represent mean \pm SEM of three independent experiments.*p<0.05, **p<0.01(*Control vs infected group); (#Infected vs experimental group).

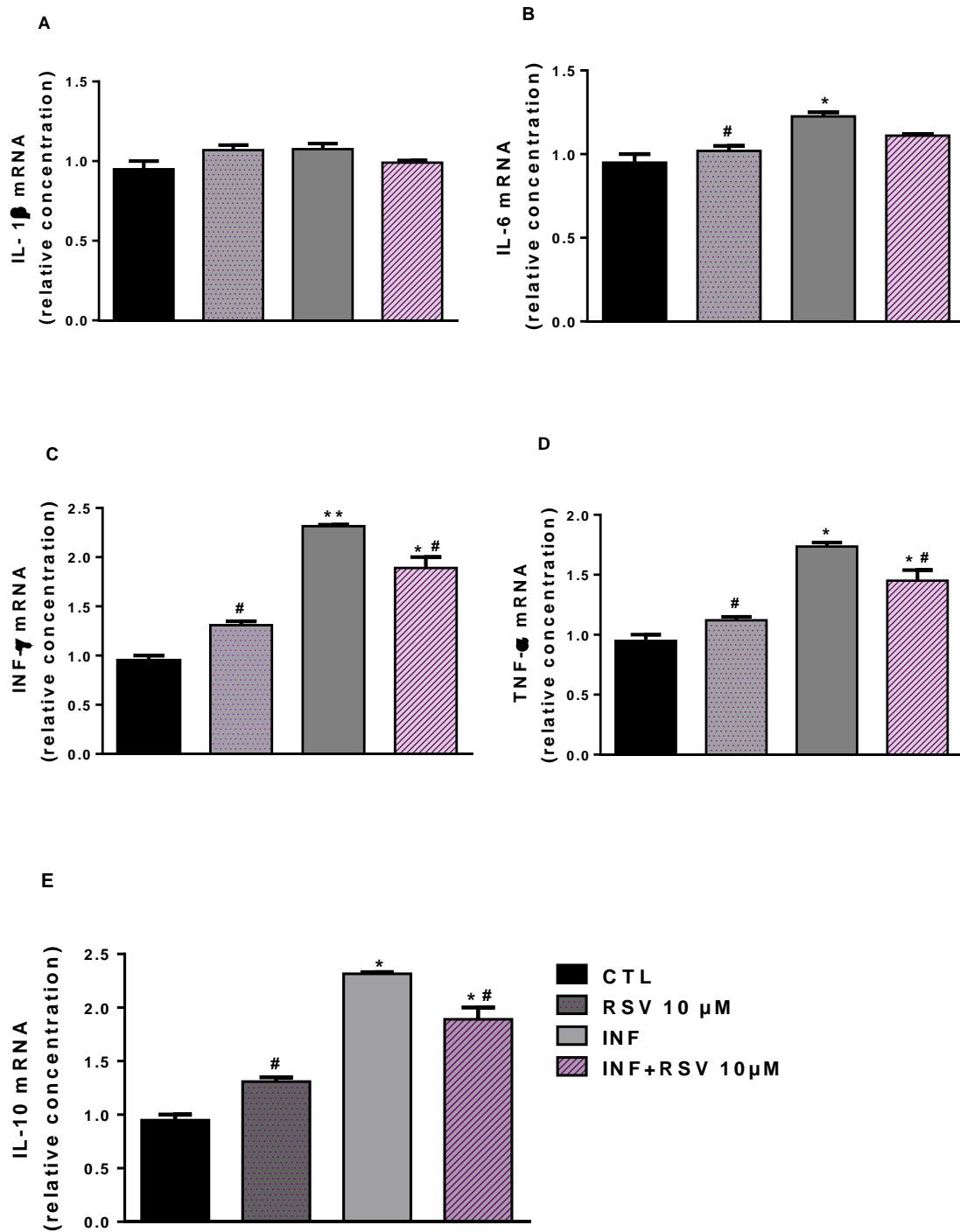
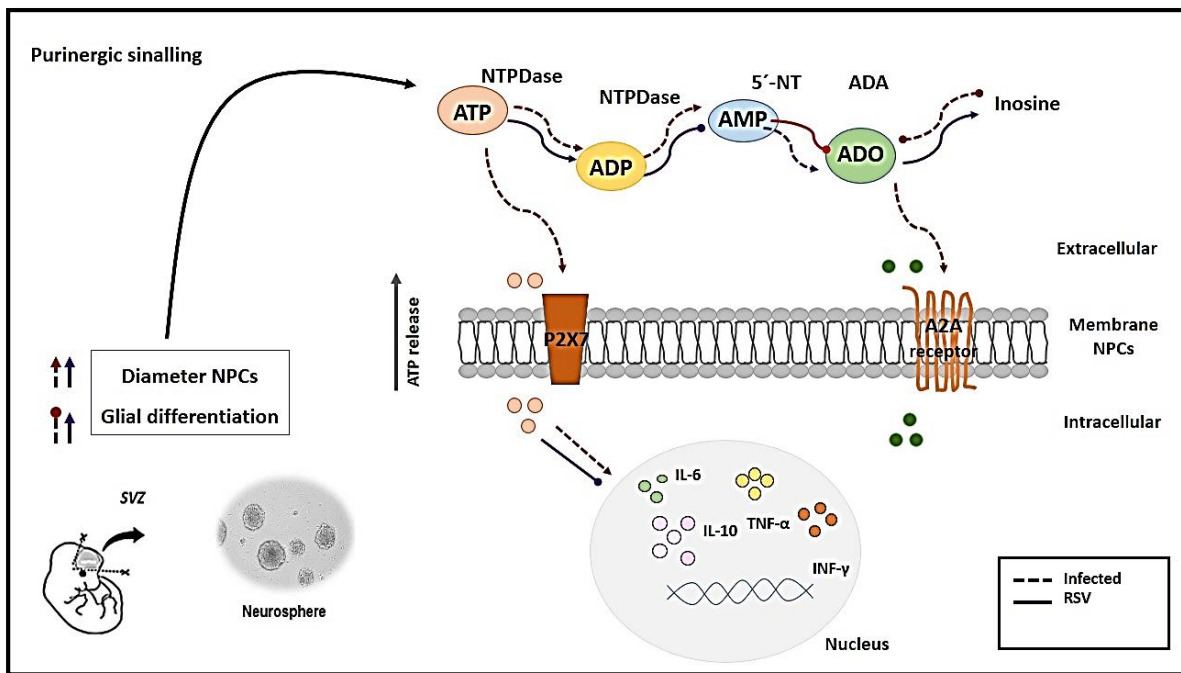


Fig. 4- Effects of RSV on cytokine gene expression profiles of differentiated NPCs infected with *T. gondii*. **A:** anti-inflammatory IL-1 β interleukin. **B:** anti-inflammatory IL-6 interleukin. **C:** interferon gamma (INF- γ) cytokine **D:** tumor necrosis factor alpha (TNF- α) cytokine **E:** proinflammatory IL-10 interleukin. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (*Control vs infected group); (#Infected vs experimental group).

Graphical Abstract



A working hypothesis for RSV effects on glial destination and immune response through purinergic activation in infected NPCs by *T. gondii*.

Manuscrito 2: Em fase de submissão

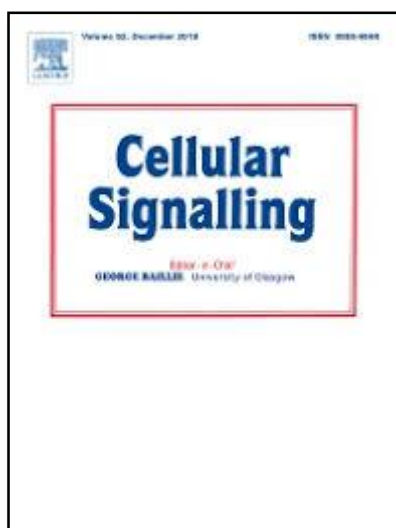
**Modulation of purinergic signalling mediated by resveratrol in mice infected by
Toxoplasma gondii: host cell defense mechanism**

Dados sobre o periódico: Cellular Signalling

ISSN: 1873-3913 (web)

Fator de Impacto: 3.93

Qualis Capes: A1



**Modulation of purinergic signalling mediated by resveratrol in mice infected by
Toxoplasma gondii: host cell defense mechanism**

Nathieli B. Bottari^a, Karine Paula Reichert^a, Mateus Fracasso^a, Anielen Dutra^a, Maria Rosa C. Schetinger^a, Vera M. Morsch^a, Aleksandro Schafer Da Silva^{a,b*}

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

^b Graduate Program in Animal Science, University of Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

*Author for correspondence: Department of Biochemistry and Molecular Biology Federal University of Santa Maria. Avenida Roraima, nº1000, Camobi District, Zip Code 97105900, Santa Maria, Brazil. E-mail: nathieli_bb@hotmail.com; aleksandro_ss@yahoo.com.

Abstract

The central nervous system of the intermediate host plays a central role in the lifelong persistence of *Toxoplasma gondii* as well as in the pathogenesis of congenital toxoplasmosis and reactivated infection in immunocompromised patients. The purinergic system has been implicated in a wide range of immunological pathways in controlling intracellular pathogen response, including *T. gondii*. Resveratrol (RSV) is a natural compound with well established antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties. In the present study, we investigated the effect of RSV on ectonucleotidases, adenosine deaminase (ADA) and purinergic receptors during chronic infection by *T. gondii* in immunocompromised mice. For this study, swiss mice were divided into four groups: control (CTL) group, resveratrol (RSV) group, infected (INF) group and INF+RSV group. The animals were infected by VEG strain (orally) and treated with RSV (100 mg/kg, orally). The enzymes activities, P2X₇, P2Y₁, A₁ and A_{2A} density receptors and ROS and TBARS levels were investigated in cerebral cortex of adult mice. *T. gondii*-infection increase NTPDase, 5'-nucleotidase and reduce ADA activities. On the other hand, the treatment with RSV regulate extracellular ATP hydrolysis by E-NTPDase and adenosine levels by ADA activity. Furthermore, RSV modulates P2X₇ and A₁ receptors in *T. gondii* infection. In short, we suggest that parasite elimination might occur following activation of the P2X₇ and A_{2A} receptors. In addition, we demonstrated that RSV down regulate the activation of purinergic receptors and enzymes in host cells and may be a therapeutic target for the treatment of neurotoxoplasmosis.

Key words: P2X₇, A₁, resveratrol, oxidative stress, *T. gondii*.

1. Introduction

Toxoplasmosis is an anthrozoosis of warm-blooded hosts caused by intracellular parasite *Toxoplasma gondii* that affect an enormous proportion of the world's population [1]. Humans become infected by ingestion of tissue cysts present in the undercooked meat, oocytes from infected cat feces, or can be acquired congenitally following primary maternal infection [2].

Congenital infections can result in abortion, intracranial calcification, hydrocephalus and retinochoroiditis consequences [3]. In addition, several studies have associated *T. gondii* infection with neurologic or psychiatric syndromes such as aggression, impulsivity, intellectual disability and schizophrenia [4, 5].

On the other hand, a reactivation of chronic infection in immunosuppressed individuals develop toxoplasmic encephalitis with considerable morbidity and mortality. Intracerebral proliferation of *T. gondii* easily disseminate in neurons and astrocytes, whereas highly phagocytic brain macrophages efficiently restrain parasite growth and may function as important inhibitors of *T. gondii* spread in the central nervous system (CNS) [6, 7].

Once into CNS, the protozoa can manipulate host resistance mechanisms at multiple points along the inflammatory pathway, such as purinergic system and oxidative stress. The purinergic system consists of nucleotides ATP (adenosine triphosphate), ADP (adenosine diphosphate), AMP (adenosine monophosphate) and nucleoside ADO (adenosine), receptors, and enzymes that control the concentration of purines, which play different vital functions in CNS, including neurotransmission, synaptic plasticity, neuroprotection and neuromodulation [8].

The concentration of these molecules of the purinergic system is controlled by the enzymes localized on the cell surface, such as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), 5'-nucleotidase (5'-NT) and adenosine deaminase (ADA). The enzyme ecto-

NTPDase is responsible for the hydrolysis of ATP to ADP and ADP to AMP, ecto-5' nucleotidase hydrolyzes AMP into adenosine, and the enzyme adenosine deaminase (ADA) deaminates adenosine into inosine [9, 10].

The involvement of purinergic receptor, especially P2X7, has recently emerged as an important component of the innate immune response against *T. gondii* infection. P2X7 has been implicated in the fusion of host cell phagosomes, the production of reactive oxygen species and modulation of host cell apoptosis [11]. The A1 receptor (A1R) is the predominant subtype in cortical areas, and plays an important role in neuroprotection [12]. While, A_{2A} receptors (A_{2A}R) is responsible for the decline in memory performance [13].

Increasing evidence shows that reactive species (RS) plays a key role in the regulation of apoptosis caused by a variety of insults, including reactive oxygen species (ROS). In addition, nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to ROS generation and ATP treatment can activate an ROS-dependent oxidative stress response and secretion of pro-inflammatory cytokines in infected macrophages [14].

In chronic CNS infection, underlies *T. gondii* ability to reactivate and cause devastating neurologic disease and death in the immunosuppressed. Thus, identifying metabolic differences between parasite and host could define new targets for pharmacological agents that would not interfere with the host metabolism, leading to more effective chemotherapies. In this study, we investigate the role of resveratrol as a factor influencing host response to *T. gondii* infection.

Resveratrol (RSV) is a non-flavonoid polyphenol, naturally present in a number of dietary sources including red grapes, berries (e.g. cranberries, bilberries, blueberries) and peanuts and red wine [15]. RSV displayed pleiotropic activities including antioxidant and anti-inflammatory effects, as well as anti-apoptotic, supporting that it is one of the most promising compounds for treating neurodiseases [16, 17].

Recently we have proposed that RSV improve behavior alterations, reduce cysts *T. gondii* in brain and inflammatory damage in mice infected by *T. gondii* [18]. Thus, in the present study we investigate the effect of RSV on behavior of newborn infected mice from congenital toxoplasmosis. Additionally, we verified whether RSV-treatment modulate purinergic signaling and reduce oxidative damage in cerebral cortex of infected female adult mice.

2. Material and Methods

2.1 Animals and infection

For this study, twenty Swiss female mice with a mean age of 60 days weighing 25 ± 5 g were kept in boxes containing five animals each, under a 12h light/dark cycle with controlled temperature and humidity (25°C, 70% respectively). The animals went through an adaptation period of 10 days and were fed with commercial feed and water *ad libitum*. The Ethics Committee on Animal of Federal University of Santa Maria (UFSM, protocol number 95090109/15) approved all animal procedures.

For the infection, VEG strain was kept in the laboratory in mice, performing a constant passage from one animal to another in order to maintain virulence. For infection of the experimental group, one of these animals was euthanized, and brain homogenate containing tissue cysts was used. The animals were experimentally infected with 150µL cerebral homogenate content eight parasitic cysts of *T. gondii* (VEG strain- type III) orally per animal.

2.2 Resveratrol

Resveratrol (C₁₄H₁₂O₃; molecular weight 228.25 g/mol; purity >98, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). RSV was diluted in 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) and water at the final dose 100 mg/kg. RSV was administered orally for 10 days in adult mice according previous results published by Bottari et al. [18].

2.3 Experimental design

Mice were randomly divided into four groups: control (CTL), resveratrol (RSV), infected (INF), and infected treated with RSV (INF+RSV). The infected group were infected on 1 day. Twenty days post infection the animals were treated with RSV over 10 days.

2.4 Brain tissue preparation

Adult mice were anesthetized with isoflurane inside an anesthetic chamber. The animals were decapitated (guillotine), their brains were removed, and separated into two hemispheres. Total brain was weighed and allocated into test tubes. The right hemisphere was homogenized 1:10 in buffer Tris-HCl 10 mmol, pH 7.2 to verify enzymatic activities and oxidative damage. The left hemisphere of the brain was used to western blot analysis.

All procedures described above were performed under refrigeration temperature (4 °C). From infected group, part of the brain from the left and from right hemisphere was used for PCR analysis.

2.5 Enzymatic assays

The E-NTPDase and E-5'-NT enzymatic activities of cerebral cortex was determined by the methods of Schetinger et al. [19] and Heymann et al. [20], respectively. The enzyme preparation (20 µL; 8–12 µg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP, ADP, or AMP). Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

ADA activity of cerebral cortex was determined according to Guisti and Galanti [21]. Brain samples (50 µL) were incubated with 21 mmol/L adenosine pH 6.5 and incubated at 37 °C for 60 min. The results are expressed in U ADO/mg protein.

2.6 Western blot

Samples of cerebral cortex were homogenized in ice-cold radio immunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) with 1mM protease and phosphatase inhibitors and centrifuged at 12.000 rpm at 4°C for 10 min. The protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Sigma Aldrich, EUA). The diluted samples were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, UK). After blocking, the membranes samples were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: P2X7, P2Y₁, A1, and A_{2A} (1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), followed by incubation with secondary antibody (1:10.000) for 90 min at room temperature. The membranes were incubated with enhanced chemifluorescent substrate (Amersham Biosciences), and analyzed with an Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). The membranes were reprobated and tested for β-actin immunoreactivity as a control for protein concentration as previously described Rebola et al. [22].

2.7 Reactive species (RS) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) measurement

Intracellular reactive oxygen species were measured by 2'-7'-Dichlorofluorescein (DCF) levels as an index of the production of RS by the cellular components [23]. DCF levels were determined using a standard curve of DCF, and the results are expressed as U DCF/mg protein.

The lipid peroxidation was determined by TBARS levels according to Ohkawa et al. [24] as an end product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). The results of TBARS levels are expressed as nmol MDA/mg of protein.

2.8 Protein determination

Protein levels were measured by Coomassie blue method as previously describe by Bradford [25] using bovine albumin serum as standard.

2.9 Statistical analysis

Results are expressed as mean values \pm standard error of mean (SEM) representative for at least three independent experiments. Statistical analysis was assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test using GraphPad Prism (Version 5.0) software. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1 RSV modulates ectonucleotidases and ADA enzymes in cerebral cortex

The results obtained for E-NTPDase, E-5'-NT, and ADA activities are shown in Figure 3. ATP (Fig. 1A) and ADP (Fig. 1B) hydrolysis by NTPDase and AMP (Fig. 1C) hydrolysis by 5'-NT was significantly increase (75%, 9%, 66% respectively) in INF group compared with CTL group. Animals treated with RSV demonstrated an increased NTPDase activity using ADP (40.53%) as a substrate ($p < 0.05$). Treatment with RSV significantly decrease ATP (25%) and AMP (30%) hydrolysis by NTPDase and 5'-NT respectively in the INF+RSV group compared with the INF group.

Infected mice by *T. gondii* decrease ADA activity (62%) when compared to control group. RSV treatment were able to increase ADA activity (38%) in cerebral cortex of infected mice when compared to INF group (Fig. 1D).

3.2 *T. gondii* alters P2X₇, P2Y₁, A₁ and A_{2A} receptors in cerebral cortex of infected mice

Considering the alterations of ectonucleotidases enzymes by *T. gondii* infection, the purinergic receptors for ATP, ADP and ADO binding were analyzed by Western blot and are shown in Figure 2.

Western blot analysis in the cerebral cortex showed a significant increase in P2X₇ density in INF group in comparison with the CTL group. RSV treatment down regulated P2X₇ receptor in *per se* effect. In addition, the results showed that RSV inhibited the up regulated co-expression of P2X₇ receptor (Fig. 2A).

However, P2X₇ density was reduce in INF+RSV group compared to INF group ($p < 0.05$) (Fig. 2A). *T. gondii*- infection induced increase P2Y₁ density in cerebral cortex ($p < 0.05$) when compared with CTL group (Fig. 2B). RSV+INF group significantly inhibited the up regulated co-expression of P2Y₁ receptor ($p < 0.05$).

In addition, A₁ density was significantly increased in INF group compared with CTL group (Fig. 2C). Infected animals treated with RSV negatively regulated A₁ receptor in cerebral cortex. The results in INF+RSV are similar to RSV group ($p > 0.05$). A_{2A} density in INF group showed a decrease in comparison with the CTL group (Fig. 2D). Infected animals treated with RSV decrease A_{2A} density receptor when compared to INF group.

3.3 Oxidative damage in cerebral cortex is trigger by *T. gondii*

Once *T. gondii* across blood-brain barrier, the parasite invades the host cell by triggering inflammatory responses in brain. Thus, we hypothesized that the presence of *T. gondii* oocysts in the cerebral cortex establishes an oxidative process leading to apoptosis of the host cell. In this sense, oxidative damage markers such as RS and TBARS were evaluated (Fig.3).

The results obtained for RS are shown in Figure 5A. The production of RS was significantly increased in the INF group compared with the control ($p < 0.05$). RSV treatment

also, increase RS in cerebral cortex, provably due to line between antioxidant and oxidant properties. However, infected animals treated with RSV demonstrated decreased RS production compared with the control group.

Besides intracellular species formation, *T. gondii* induce membrane damages (Fig. 3B). TBARS levels were significantly increased in the INF group compared with the control group ($p < 0.05$). Infected animals treated with RSV showed decreased TBARS levels in cerebral cortex compared to INF group. Treatment RSV *per se* had no influence in TBARS levels ($P > 0.05$).

4. Discussion

T. gondii has high predilection to CNS during a chronic infection. The parasite colonizes the brain tissue via the blood stream and may persist in encysted form. However, latent toxoplasmosis can lead to congenital *T. gondii* infections are manifested in several ways such as spontaneous abortions, cognitive impairments to fetus and stress experienced in utero [26]. In the present study, we examined the neuroprotective effect of RSV on behavior infected newborn mice.

Different mechanisms have been developed by both host and parasite to limit the immune response during toxoplasmosis disease. In this context, the purinergic system exerts multiple roles in the development, plastic remodeling and regeneration of the CNS. Purinergic signaling is a common route of cell-cell communication involved in many neuronal and non-neuronal mechanisms and in short- and long-term events, including immune responses, inflammation, pain, platelet aggregation, vasodilation, proliferation and cell death [8]. In our study, we investigate the role of RSV on ectonucleotidases activity and P2X7, P2Y₁, A₁ and A_{2A} density receptors in cerebral cortex of infected mice.

In this study, the enzyme NTPDase rapidly hydrolyze ATP, or it bind to P2 receptor and trigger a signaling cascade in cerebral cortex (Fig. 1A and 2A). *T. gondii* increase ATP (Fig. 1A) and ADP (Fig. 1B) as well as AMP (Fig 1C) hydrolysis by E-NTPDase and E-5'-NT enzymes respectively. This increase in enzyme activity can be seen as an adaptive mechanism to reduce purine levels especially ATP and ADP extracellular, conferring a certain degree of host cellular protection.

To strengthen the hypothesis of the occurrence of a protective down regulation of ATP, the activity of ADA was evaluated. Infected mice showed a decrease of ADA activity in cerebral cortex when compared with control group (Fig. 1D). ADA is responsible for the regulation of the adenosine concentration (ADO) in the extracellular environment [12]. In pathological conditions, ADO plays a protective role by modulating the release of neurotransmitters and also acting as an endogenous regulator of innate immunity and in the defense of the host of excessive tissue damage associated with inflammation [12], which is considered a signaling molecule of cellular damage, but with antagonistic actions of ATP.

The extracellular ATP (e ATP) and ADO, depending on its concentration and site of action, has pro and anti-inflammatory actions [28, 29]. When at low concentrations, e ATP has affinity for P2Y receptors, located on the surface of microglia (immune resident cells in CNS) and macrophages [30]. These receptors, when stimulated, promote down regulation in the expression and release of pro-inflammatory cytokines, stimulate a Th2 response, and lead to the release of anti-inflammatory cytokines (IL-10), promoting a protective effect by being able to avoid or to minimize excessive tissue damage [28]. On the other hand, high e ATP levels binding to P2X₇ receptor releasing pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6.

Our findings showed *T. gondii*-induced stimulate P2X₇ and P2Y₁ receptors in cerebral cortex when compared with control group. Probably high ATP levels bind to P2X₇ up regulating this expression. Similarly, ATP and ADP both binding to P2Y₁ receptor increasing

its cellular expression. The treatment with RSV was effective reducing down regulating P2X7, but not P2Y₁ receptor. The protective effect of RSV have been showed in neuropathic pain mediated by the P2X7 receptor [31]. In addition, *T. gondii* infection decrease A1 receptor density (Fig.2C) act as a positive feedback to control ATP hydrolysis.

The treatment with RSV seems to not influence in A_{2A} receptor during *T. gondii* infection (Fig. 2D). However, during *T. gondii*-infection, the lower ADO levels are likely by A_{2A} receptor-mediated signaling. The A_{2A}, but not the A1 receptors are the major expressed and functionally coupled adenosine receptors in mouse peripheral T and B lymphocytes, and the adenosine-induced cAMP accumulation correlates with the expression of A_{2A} receptors.

Some studies have been reported that cellular ATP is required for induction of apoptosis, and its depletion results in necrosis in infected cells by *T. gondii*. Correa et al. [11] demonstrated that the stimulation of murine macrophages with 3 mM ATP for 30 min triggered the elimination of the parasite in a manner dependent on the P2X7 receptor [11]. This death was associated with an increase in the production of ROS in infected macrophages after ATP stimulation.

The intracellular parasite increase RS and TBARS levels when compared with control group (Fig. 3) inducing to oxidative stress. Previous studies revealed that *T. gondii* infection can lead to oxidative stress and immune suppression [32, 33]. Th2 immune can be seen in the normal maternal-fetal interface, which is unfavorable to the elimination of pathogens and enhances susceptibility to toxoplasmosis [33]. Thus, *T. gondii* infection or the reactivation of latent infection during pregnancy will increase oxidative stress in the placenta, contribute to cell apoptosis and placenta damage, and, finally, lead to spontaneous abortions.

RSV also proved to be a potent anti-oxidant restoring RS and TBARS levels in infected mice. RSV has a variety of established biological and pharmacological properties that contribute to its beneficial effects in the prevention and treatment of various pathologies. One

of the most known and important properties of RSV is its high antioxidant capacity, attenuating the effects of the reactive species produced in the organism [34, 35].

In short, our study provides the potential effects of *T. gondii* on purinergic signalling mediated by RSV treatment. Our data indicate that RSV treatment promote down regulation of ectoenzymes and inhibit over density of P2X7 and A1 receptors in cerebral cortex of infected mice (Fig. 4). Furthermore, RSV treatment seems be a potential target to treatment of congenital toxoplasmosis. Future studies of these effect will not only contribute to our understanding of the mechanisms and functional significance of neurodevelopment in newborn infected mice, but may also lead to novel strategies for therapy of neurological disease induced by *T. gondii*.

Conclusion

In conclusion, this study reveals some mechanisms involved in the neuroprotective effect of RSV demonstrating that *T. gondii* trigger activation of purinergic cascade in host cells as a compensatory mechanism to avoid cellular damage. Thus, the comprehension of the role played purinergic signaling against *T. gondii* could be a powerful tool for the development of new strategies against toxoplasmosis. Together the data indicate inhibitory effects of RSV on purinergic signaling and oxidative damage as a potent target to treatment of congenital toxoplasmosis and neurotoxoplasmosis.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Financial support

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX, Process N°. 88887.186030/2018-00) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Project N°. 304,328/2015–4).

References

- [1] Tenter A.M.T., Heckeroth A.R., Weiss L.M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30: 1217-1258.
- [2] Hill D.E., Dubey J.P. (2018) *Toxoplasma gondii*. In: Ortega Y., Sterling C. (eds) *Foodborne Parasites. Food Microbiology and Food Safety*. Springer, Cham
- [3] McAuley, J.B (2014) Congenital Toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 3: S30–S35. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu077>.
- [4] Mortensen P.B., Norgaard-Pedersen B., Waltoft B.L., Sorensen T.L., Hougaard D., Yolken R.H. (2007) Early infections of *Toxoplasma gondii* and the later development of schizophrenia. *Schizophr Bull* 33:741–744.
- [5] Cook T.B., Brenner L.A., Hartmann C.M., Konte B., Fried M., Brundin L., Groer M.W., Can, A., Rujescu D., Postolache T.T. (2015) “Latent” infection with *Toxoplasma gondii*: Association with trait aggression and impulsivity in healthy adults. *Journal of Psychiatric Research* 60: 87-94.
- [6] Cabral C.M., Tuladhar S., Dietrich H.K., Nguyen E., MacDonald W.R., Trivedi T., et al. (2016) Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 12(2): e1005447. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005447>
- [7] Mendez O.A., Koshy A.A. (2017) *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog* 13(7): e1006351. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006351>
- [8] Burnstock G., Boeynaems J.M. (2014) Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal*.10:529-564.
- [9] Zimmermann H. (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature, in: *Drug Dev. Res.* pp. 44–56.
- [10] Yegutkin G.G. (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783:673–694.
- [11] Corrêa G., Da Silva, C.M., Moreira-Souza A.C.A., Vommaro R.C., Coutinho-Silva R. (2010) Activation of the P2X₇ receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes and Infection*12:497e504.
- [12] Cunha R.A (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors, *Neurochem. Int.* 38)107–125.
- [13] Duarte J.M.N, Oliveira C.R., Ambrósio A.F., Cunha R.A. (2006) Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats, *Neurochem. Int.* 48: 144–150.
- [14] Cruz C.M., Rinna A., Forman H.J., Ventura A.L., Persechini P.M., Ojcius D.M. (2007) ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282(5):2871–2879

- [15] Frémont L. (2000) Biological effects of resveratrol. *Life sciences* 66:663-673.
- [16] Baur J.A., Sinclair D.A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 493–506.
- [17] Das S., Das D.K. (2007) Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 6:168-173.
- [18] Bottari N.B., Baldissera M.D., Tonin A.A., Rech V.C., Alves C.B., D`Avila F., Thomé G.R., Guarda N.S., Moresco R.N., Camillo G., Vogel F.F., Luchese C., Schetinger M.R.C., Morsch V., Tochetto C., Figuera R., Nishihira V.S.K. Da Silva A.S. (2016) 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*. 95:166-174. doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.002.
- [19] Schetinger M.R.C., Porto N.M., Moretto M.B., Morsch V.M., Da Rocha J.B.T., Vieira V., Moro F., Neis R.T., Bittencourt S., Bonacorso H.G., Zanatta N. (2000) New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities, *Neurochem. Res.* 25: 949–955.
- [20] Heymann D., Reddington M., Kreutzberg G.W. (1984) Subcellular Localization of 5'-Nucleotidase in Rat Brain, *J. Neurochem.* 43:971–978.
- [21] Guist G., Galanti B. (1984). Colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim.315–323.
- [22] Rebola N., Pinheiro P.C., Oliveira C.R., Malva J.O., Cunha R.A. (2003) Subcellular localization of adenosine A1 receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus, *Brain Res.* 987:49–58.
- [23] Myhre O., Andersen J.M., Aarnes H., Fonnum F. (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation, *Biochem. Pharmacol.* 65: 1575–1582.
- [24] Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1995) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95: 351–358.
- [25] Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- [26] Jones J. L., Lopez A., Wilson M., Schulkin J., Gibbs R (2001) Congenital toxoplasmosis: A review. *Obstetrical & Gynecological Survey* 56: 296–305.
- [27] Bottari, N.B., Schetinger, M.R.C., Pillat, M.M. et al (2018) Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogliogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii*. *Mol Neurobiol*.<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1180-z>.
- [28] Di Virgilio F. (2005) Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*.1: 205-209.
- [29] Boeynaems J.M., Communi D. (2006) Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. *Journal of Investigative Dermatology*.126: 943-944.

[30] Di Virgilio, F. et al. (2009) Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends in Neurosciences*.32:79-87.

[31] Xie J., Liu S., Wu B., Li G., Rao S., Zou L., Yi Z., Zhang C., Jia T., Zhao S., Schmalzing G., Hausmann R., Nie H., Li G., Liang S. (2017) The protective effect of resveratrol in the transmission of neuropathic pain mediated by the P2X₇ receptor in the dorsal root ganglia. *Neurochemistry International* 103: 24-35.

[32] Xu X., Liu T., Zhang A., Huo X., Luo Q., Chen Z., Yu L., Li Q., Liu L., Lun Z.R., and Shen J (2012) Reactive Oxygen Species-Triggered Trophoblast Apoptosis Is Initiated by Endoplasmic Reticulum Stress via Activation of Caspase-12, CHOP, and the JNK Pathway in *Toxoplasma gondii* Infection in Mice. *Infect and Immunity* 80: 2121–2132.

[33] Dincel G.C., Atmaca H.T. (2016) Role of oxidative stress in the pathophysiology of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 29:226-40.

[34] King R.E., Bomser J.A., Min D.B. (2006) Bioactivity of resveratrol. *Comprehensives reviews in Food Science and Food Safety* 5:65-70.

[35] Fabris S., Momo F., Ravagnan G., Stevanato, R (2008) Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry* 135:76–83.

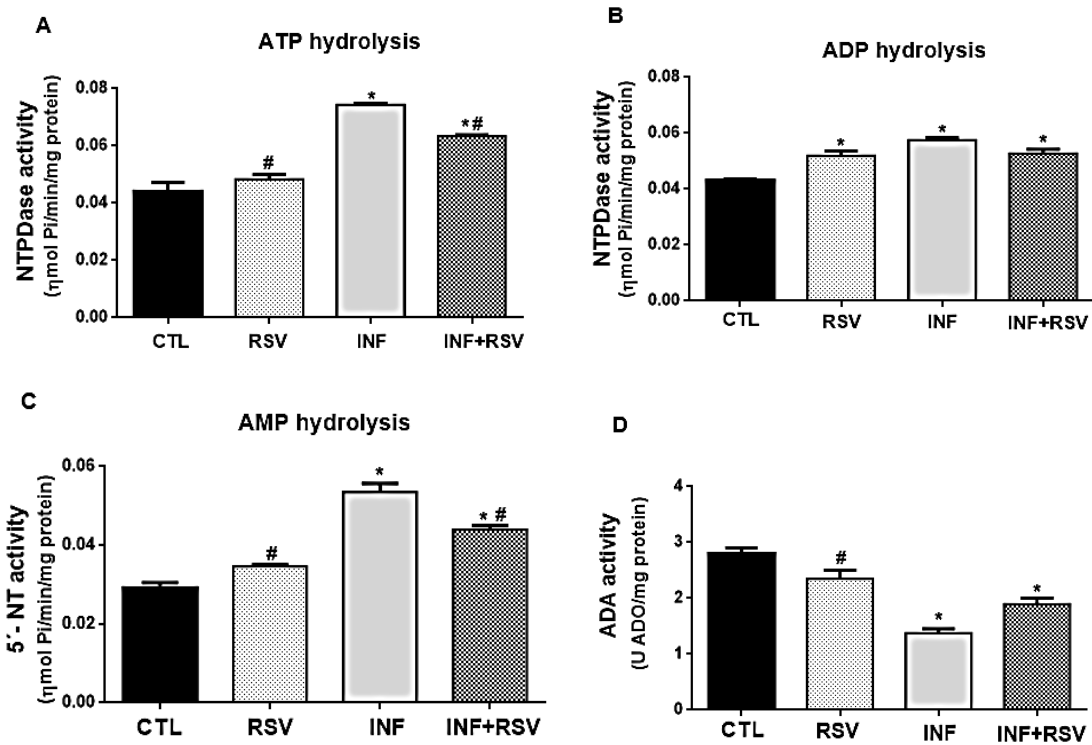
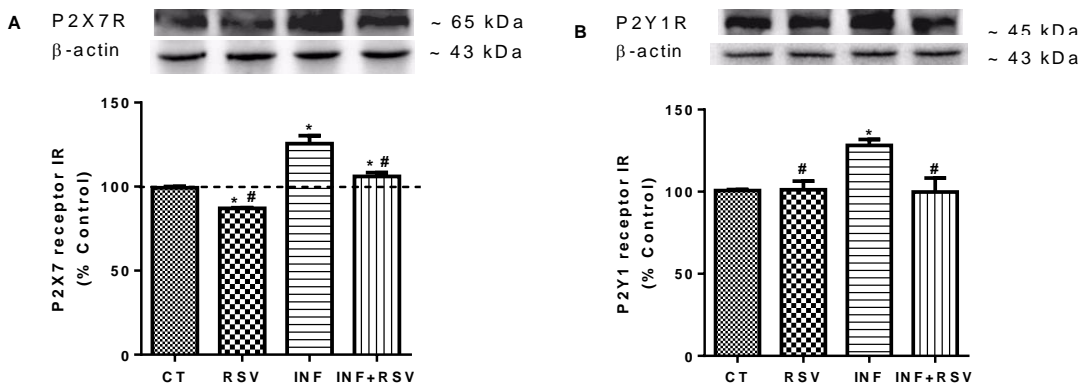


Fig. 1 – Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), 5'-nucleotidase (5'-NT), and adenosine deaminase (ADA) activities in cortex from *T. gondii*-induced infection treated with RSV using ATP (A), ADP (B), AMP (C), and adenosine (D) as a substrate. The data represents mean \pm SEM of three independent experiments using ANOVA with post-hoc Tukey test. * $p < 0.05$ (* Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).



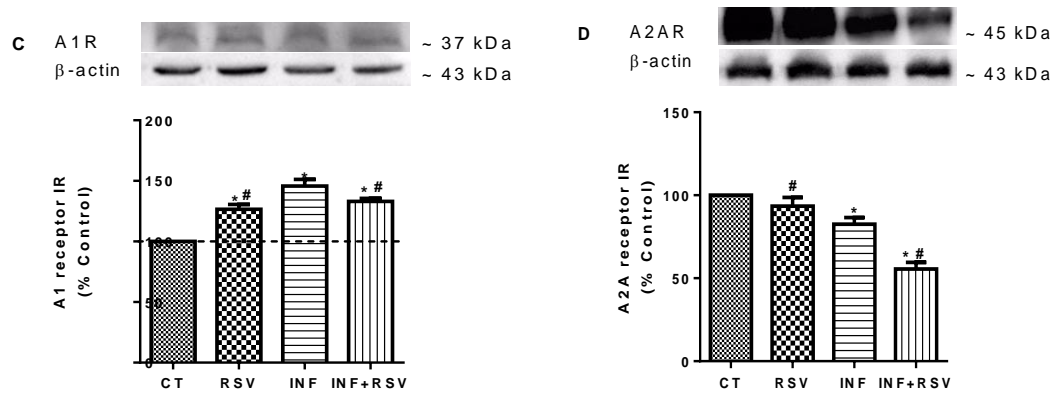


Fig. 2 - Western blot quantification of P2X7 (A), P2Y₁ (B), A1 (C), A_{2A} (D) receptors in total membranes of the cerebral cortex of mice treated with RSV and infected by *T. gondii*. β-actin was used as a loading control to normalize protein levels. Values are expressed as the mean ±S.E.M. (*p <0.05, n=3). ANOVA with post-hoc Tukey test. (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

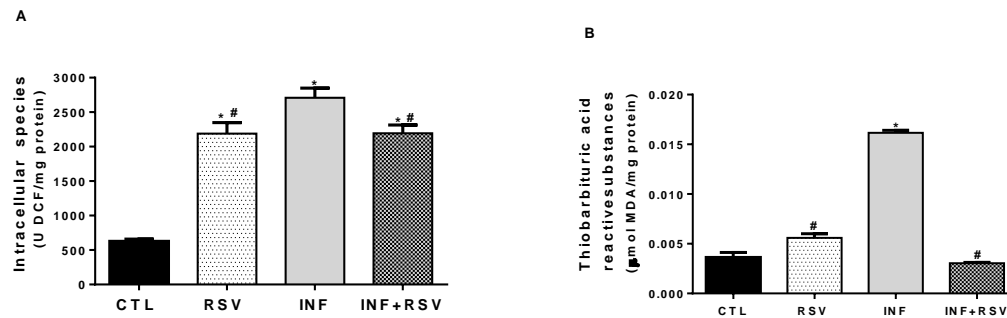


Fig. 3 – RSV prevent oxidative damage in cerebral cortex induced by *T. gondii*. **A:** Intracellular reactive species production by 2'-7'-dichlorofluorescein levels in the cerebral cortex of *T. gondii*-infection induced mice treated with RSV. **B:** Lipid peroxidation measure by thiobarbituric acid reactive substances in the cerebral cortex of *T. gondii*-induced mice treated with RSV. The data represents mean ± SEM. ANOVA with post-hoc Tukey test. (*p<0.05, n=5)(* Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

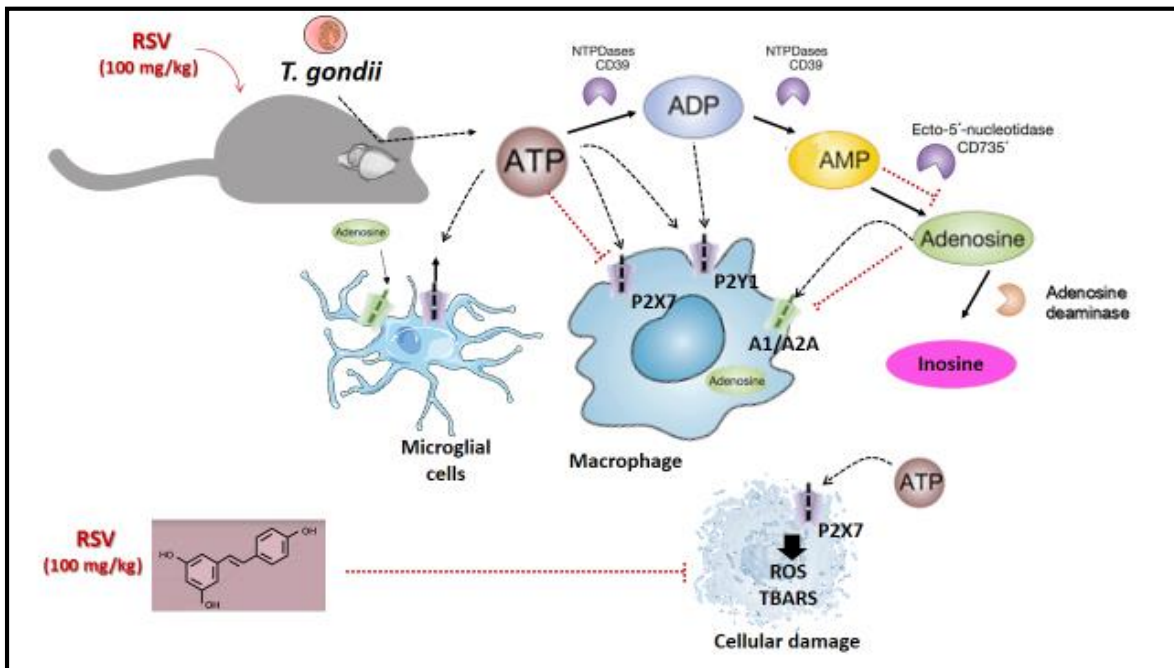


Figure 4- A working hypothesis for RSV response through purinergic down regulation in cerebral cortex of infected mice. *T. gondii* infection increase extracellular ATP hydrolysis by E-NTPDase and E-5'-NT enzymes in cerebral cortex. ADA activity regulate ADO levels and indirectly ATP hydrolysis. High ATP levels binding to P2X7 and P2Y1 receptors that supposedly activate host cell immune response and promoting cellular damage. ADO binding to A1 and A2A receptors to confers protection. RSV decrease the activity of the ectonucleotidases and inhibit the overexpression of P2X7 and A1 receptors probably due to their anti-inflammatory properties.

Manuscrito 3: Resultados preliminares em fase de preparação

**Resveratrol provides neurobehavioral and neurogenesis in newborn mice infected by
*Toxoplasma gondii***

Resveratrol provides neurobehavioral and neurogenesis in newborn mice infected by
Toxoplasma gondii

Nathieli B. Bottari^a, Karine Paula Reichert^a, Mateus Fracasso^a, Anielen Dutra^a, Maria Rosa C. Schetinger^a, Vera M. Morsch^a, Aleksandro Schafer Da Silva^{a,b*}

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

^b Graduate Program in Animal Science, University of Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

*Author for correspondence: Department of Biochemistry and Molecular Biology Federal University of Santa Maria. Avenida Roraima, nº1000, Camobi District, Zip Code 97105900, Santa Maria, Brazil. E-mail: nathieli_bb@hotmail.com; aleksandro_ss@yahoo.com.

Abstract

Toxoplasma gondii is a neurotropic parasite if acquired for the first time during pregnancy, can be transmitted to the fetus resulting in behavior alterations. Acquired infection is associated with production of pro inflammatory cytokines and severe immune response in brain. In the present study, we evaluate the role of *T. gondii* on behavior alterations through congenital transmission. For this study, female mice were infected with *T. gondii* VEG strain (orally 50 cysts/mL). Twenty days after birth the newborns were divided into groups (n = 8): CTL (uninfected and untreated); RSV (treated with RSV 50 mg/kg); INF (infected with *T. gondii*); INF + RSV (infected and treated with RSV 50mg/kg). The animals received an injection of BrdU (50mg/ kg), the brain was fixed in paraformaldehyde and dissected to evaluate the neurogenesis. The behavioural data showed an anxiogenic like behavior in infected mice when compared with control group. Furthermore, infected newborn mice decrease short and long-term memory in object recognition task when compared to control. However, our findings suggest the treatment with RSV as an important neuroprotective molecule since restore neurobehavioural changes induced by *T. gondii*.

Key words: resveratrol; learning memory; anxiety; neurogenesis hippocampal.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite that affect an enormous proportion of the world's population (Elmore et al., 2010). Humans become infected by ingestion of tissue cysts (containing bradyzoites) present in the undercooked meat, oocysts from infected cat feces, or can be acquired congenitally following primary maternal infection (Dubey 2010).

Considerable morbidity and mortality in immunosuppressed individuals, in particular toxoplasmic encephalitis, is caused by reactivation of chronic infection, and severe fetal abnormalities can occur in association with primary maternal infection (Tenter et al. 2000). Although the majority of infected healthy individuals have no symptoms, in immunocompromised people or in congenitally infected individuals, infection can cause severe disease or even death often caused by damage to the brain, eyes or other organs (Dubey 2010).

Once into central nervous system (CNS), the protozoa can manipulate host resistance mechanisms at multiple points including the brain repair and inflammatory pathways such as neurotransmission, synaptic plasticity, neuromodulation and behavior (Bottari et al. 2018). It is suggested that the presence of the parasite in the specified regions of the brain resulting in behavioral changes. Since the hippocampus and amygdala are brain structures connected with natural defense behaviors and neurogenesis (da Silva and Langoni 2009).

Recently our research group has investigated the role of resveratrol (RSV) as a possible therapeutic target for the treatment of toxoplasmosis. RSV has been identified from a number of dietary sources including red grapes, berries (e.g. cranberries, bilberries, blueberries) and peanuts. RSV displays potent antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activity (Berman et al. 2017). Bottari et al. (2016) showed that the treatment with free and nanostructured RSV reaches the CNS of infected mice reducing the number of tissue cysts and improved behavior alterations.

Thus, the aim of this study is to provide that RSV is a potential target to for parasite-induced behavioral changes in newborn mice and investigates the role of RSV during hippocampal neurogenesis.

2. Material and Methods

2.1 Animals and infection

For this study, twenty Swiss female mice with a mean age of 60 days weighing 25 ± 5 g were kept in boxes containing five animals each, under a 12h light/dark cycle with controlled temperature and humidity (25°C, 70% respectively). The animals went through an adaptation period of 10 days and were fed with commercial feed and water *ad libitum*. The Ethics Committee on Animal of Federal University of Santa Maria (UFSM, protocol number 95090109/15) approved all animal procedures.

The animals experimentally infected with *T. gondii* tachyzoites from VEG strain (type III) orally 50 cysts/mL. The female mice were placed in breeding groups of three virgin females and one male in an opaque plastic cage (50 x 25 x 18 cm). Mating lasted 21 days, and pregnant mice were selected and placed in individual cages containing wood shavings as nesting material. All newborn mice were used as object of this study.

2.2 Resveratrol

Resveratrol (C₁₄H₁₂O₃; molecular weight 228.25 g/mol; purity >98, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) was diluted in 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) and water at the final dose 50 mg/kg. RSV was administered orally for 20 days in newborn mice at same dose. The dose used was adapted of previous studies reported by Bottari et al. (2014).

2.3 Experimental design

Newborn mice were randomly divided into four groups (n=8): control (CTL), resveratrol (RSV), infected (INF), and infected treated with RSV (INF+RSV). The infected group were submitted to infection on 0 day.

Twenty days post infection the animals were treated with RSV over 20 days. The newborn mice were observed on the day of birth (day 0), the litters were culled to eight pups (4 males and 4 females, whenever possible) and the pups examined for the occurrence of gross malformations. Right after birth, newborn mice were treated orally with RSV 50 mg/kg during 20 days. Pups were submitted to behavioral tests. Twenty-four hours after the last day of the behavioral tests, mice were euthanized and reperused with 4% paraformaldehyde buffer and the brain was collected for analysis of hippocampal neurogenesis.

2.4 Motor tests

Motor tests were assessed by clift, crossing and climbs through open-field testing apparatus (box 15 cm x 15 cm) surrounded by walls of 10 cm high containing marks on the floor made by tape markers, thus, dividing each square into nine squares according to adapted method describe by Mello et al., (1998). A camera was vertically mounted above the arena and the newborn mice were observed on a monitor in an adjacent room. The pups were introduced in the center of box and an observer (unaware of rat condition) scored the number of clift, crossing and climbs during 4 min. The data are expressed mean±S.E.M.

2.5 Elevated plus-maze (EPM)

The anxiolytic-like behavior was verify in pups 20th day after birth according methodology describe by Mello et al., (1998) with some modifications. The apparatus consist of adapted two elevated (15 cm high) and open arms (12×2.5 cm) positioned opposite to one

another and separated by a central platform (2.5×2.5 cm), and two arms of the same dimension, enclosed by walls (12×2.5×5 cm) forming a cross. During a 4 min test period, the number of entries either to the open or closed arms, plus the time spent in the open arms were recorded. Changes in the percent of time spent on the open arms indicate changes in anxiety, whereas the number of closed arm entries is the best measure of general activity in the maze.

2.6 Novel object recognition

To assess short and long-term memory a novel object recognition task was used. The animals passed by habituation, where newborn mice were placed into the empty arena (38×38×30cm, PVC) for 4min. Two identical objects were placed into the arena during a 4 min sample phase. Subsequently, one of the objects was exchanged by a new object and memory was assessed by comparing the time spent exploring the novel object as compared with the time spent exploring the familiar object during a 4min test phase 4hs after training test. Twenty four hours after memory acquisition, were exposure to a familiar and a new object. During all experiments the behavior of the animals was recorded. Objects with both, different shape and different color (red, black, white) were considered to be distinct from the original sample objects. The relative exploration was quantified and expressed by number of explorations of familiar and new object.

2.7 Statistical analysis

Results are expressed as mean values ± standard error of mean (SEM) representative for at least three independent experiments. Statistical analysis was assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test using GraphPad Prism (Version 5.0) software. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1 Effect of RSV on motor development of infected newborn mice

Virtual Cliff, crossing and climbs parameters are presented in table 1. No significant differences between groups were observed in locomotor activity of newborn mice ($p > 0.05$).

3.2 Effect of *T. gondii* infection and RSV treatment on anxiolytic-like behavior

To investigate the effects of *T. gondii* on behavior associated with anxiety, the animals were placed in the central square of the plus-maze facing a closed arm and its behavior observed for 4 min by an observer blind to the treatment. Infected animals by *T. gondii* spent more time in close arms when compared with control group (Fig. 1A). RSV group increase the time spent in open arms in a *per se* effect when compared with CT group ($p < 0.05$) showing RSV improve depressive like behavior during toxoplasmosis.

Similar results in number of entries in close and open arms were observed (Fig. 1B). Infected animals decrease the number of explorations in open and close arms when compared with control group. On the other hand, RSV treatment repair depressive-like behavior in infected mice since increase the entries in open arms.

3.3 RSV prevents impairment of memory induced by *T. gondii*

Short and long-term memory was assessed by the object recognition and the data are shown in figure 2. *T. gondii*-induce decrease the number of new object exploration 4hs after training (Fig. 2A) when compared with control group ($p < 0.05$). No significant differences were observed between experimental groups and acquisition memory 4hs after training test in RSV and INF+RSV groups.

Infected newborn mice by *T. gondii* decrease the number of new object exploration 24hs after training test indicating impairment on consolidation memory (Fig. 2B). RSV treatment

acts as a neuroprotective molecule increasing the number of new object explorations in both RSV and INF+RSV groups in comparison with infected group ($p < 0.05$).

4. Discussion

T. gondii has high predilection to CNS during a chronic infection. The parasite colonizes the brain tissue via the blood stream and may persist in encysted form. However, latent toxoplasmosis can lead to congenital *T. gondii* infections are manifested in several ways including intra-cerebral calcification, hydrocephalus, and retinocorditis (Blanchard et al., 2015). The most relevant aspect during toxoplasmosis is when fetal infection occurs during pregnancy clinical outcomes of infection can result from spontaneous abortions, cognitive impairments to fetus and stress experienced in utero (Jones et al., 2001). In the present study, we examined congenitally *T. gondii*-infection to determine whether their behavior was different from controls. We also examined the neuroprotective effect of RSV on behavior infected newborn mice.

Bottari et al., (2018) have reported congenital transmission of *T. gondii*. The authors showed congenital infection and *T.gondii* DNA in brain and neural progenitor cells in similar mechanism of infection (orally). It also has been suggested that maternal exposure to *T. gondii* infection is a risk factor for the development of psychoses other than schizophrenia (Mortensen et al., 2007; Xiao et al., 2009). Based on the mentioned findings, we hypothesized congenital *T. gondii* infection can result in loss of exploratory, learning and memory behaviors. Our findings suggest a depressive-like behavior in infected newborn mice (Fig. 1). Infected animals spent more time in closed arms (Fig.1A) and explore less open arms (Fig 1B) in comparison with control. However, RSV treatment improve an anxiolytic-like behavior in infected mice acting as an important neuroprotective molecule.

Additionally, the results indicates that *T. gondii* decrease short and long-term memory in object recognition task (Fig.2). *T. gondii*-induced reduce the number of new object explorations 4hs (Fig. 2A) and 24hs (Fig. 2B) after training test resulting in loss of acquisition and consolidation memory. Our results are in accordance with Smart and Goodwin (2012) that reported congenital infection of mice with *T. gondii* induces change in behavior.

Surprendently, RSV seems to repair the memory loss 4 and 24 h after the training object recognition test in infected mice in a *per se* effect. Similar results were showed by Bottari et al., (2016) proposed benefic effect of RSV on behavior alterations in adult mice experimentally infected by *T. gondii*. No significant differences were observed in motor tests (Table 1), revealing that motor activity was not affected by parasite, so it does not influence the other tests evaluated. These behavior changes may represent minimal effects on memory and anxiolytic that were restored by RSV treatment.

5. Conclusion

In conclusion, this study reveals some mechanisms involved in the neuroprotective effect of RSV restoring cognitive impairments in newborn mice after congenital transmission by *T. gondii*.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Financial support

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX, process number 23038.005848/2018-31). CAPES/PROEX - Project N°. 0737/2018.

References

Berman A.Y., Motechin R.A., Wiesenfeld M.Y., Holz M.K. (2017) The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. NPJ Precision Oncology 35:

Blanchard N., Dunay I.R., Schlüter D. (2015) Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: a fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system. *Parasite immunology* 37: 150-158.

Bottari N.B., Baldissera M.D., Tonin A.A., Rech V.C., Alves C.B., D`Avila F., Thomé G.R., Guarda N.S., Moresco R.N., Camillo G., Vogel F.F., Luchese C., Schetinger M.R.C., Morsch V., Tochetto C., Figuera R., Nishihira V.S.K. Da Silva A.S. (2016) 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*. 95:166-174. doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.002.

Bottari, N.B., Schetinger, M.R.C., Pillat, M.M. et al (2018) Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogliogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii*

Da Silva RC, Langoni H (2009) *Toxoplasma gondii*: host–parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Res* 105:893–898

Dubey JP (2010) *Toxoplasmosis of animals and humans*. Boca Raton,, Florida: CRC Press. 313 p.

Jones J. L., Lopez A., Wilson M., Schulkin J., Gibbs R (2001) Congenital toxoplasmosis: A review. *Obstetrical & Gynecological Survey* 56: 296–305.

Mello C.F., Kraemer C.K., Filippin A., Morsch V.M., Rodrigues A.L.S., Martins A.F., Rubin M.A.(1998) Effect of lead acetate on neurobehavioral development of rats. *Braz J Med Biol Res* vol. 3.

Mortensen P.B., Norgaard-Pedersen B., Waltoft B.L., Sorensen T.L., Hougaard D., Yolken R.H. (2007) Early infections of *Toxoplasma gondii* and the later development of schizophrenia. *Schizophr Bull* 33:741–744.

Smart J.L., Dobbing J. (1971) Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research*, 28: 85-95.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217–1258

Xiao, J., Buka S.L., Cannon T.D., Suzuki Y., Viscidi R.P., Torrey E.F., Yolken R.H. (2009) Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes and Infection* 11: 1011– 1018

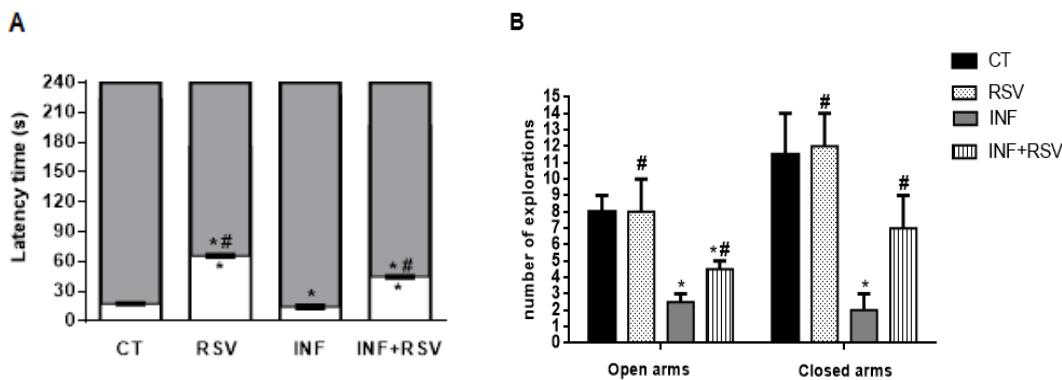


Fig. 1 –*T. gondii*-infection alters behavior of newborn mice spent less time in open arms by plus-maze open test. **A:** Latency time in open arms (white color) and close arms (grey color) spent in elevated plus-maze task. **B:** Number of entries in open and closed arms. CT (control group); RSV (resveratrol group); INF (infected group); INF+RSV (infected and treated group). Data are presented as mean \pm SEM using ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $p < 0.05$, $n=8$). (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

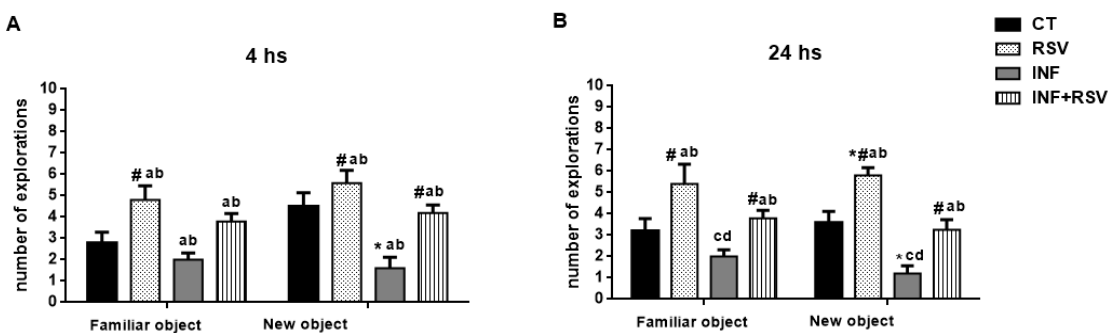


Fig. 2– RSV promotes short and long-exploratory memory in newborn mice infected by *T. gondii*. **A:** number of familiar and new object recognition 4 hs after training test **B:** number of familiar and new object recognition 24 hs after training test. CT (control group); RSV (resveratrol group); INF (infected group); INF+RSV (infected and treated group). Data are presented as mean \pm SEM using ANOVA followed by Tuckey's post hoc test (* $p < 0.05$, $n=8$). Different letters indicate significant differences between familiar and new object); (*Control vs infected groups) (#Infected vs experimental group).

Table 1 – Parameters evaluated in motor test observation by open-field test.

Groups (n=8)	Clift	Crossing	Climbs	Gender (n)
CTL	4 \pm 2,5	35 \pm 5,2	2 \pm 1,7	3 M; 5 F
RSV	5 \pm 3,2	29 \pm 4,2	2 \pm 2,3	4 M; 4F
INF	2 \pm 0,5	27 \pm 5,3	1 \pm 0,5	5M; 3F
INF+ RSV	4 \pm 2,3	28 \pm 5,4	1 \pm 0,75	4M; 5 F

M = male; F= female. Data means \pm S.E.M. Non-parametric ANOVA following Tukey's post hoc test (* $p < 0.05$).

4. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento do SNC, as células-tronco e as CPNs tem a tarefa de proliferar, migrar, diferenciar, morrer ou amadurecer através de divisões assimétricas e simétricas altamente precisas (KEPERMANN; SONG; GAGE, 2015). Uma vez formado o cérebro de um animal adulto, as células interagem de modo perfeito comunicando-se através de extensas redes neurais, neurotransmissores e mensageiros químicos conforme detalhado na seção introdução desta tese. Entretanto, patógenos intracelulares a exemplo do *T. gondii* podem provocar alterações neuroquímicas durante o desenvolvimento do cérebro à medida em que a infecção persiste modulando negativamente a neurogênese e a plasticidade sináptica (GOMES e BARBOSA, 2017).

O *T. gondii* é um dos protozoários de maior sucesso biológico já reconhecidos, e estima-se que o parasito acometa cronicamente 1/3 da população mundial (HILL e DUBEY, 2018). Apesar de ser um parasita intracelular obrigatório, este protozoário tem notável transmissibilidade e permanentemente infecta diversos tipos de células (DUBEY 2012; 2014). Estudos utilizando culturas primárias de humanos e roedores estabeleceram que o *T. gondii* é capaz de infectar e encistar tanto astrócitos quanto neurônios, os dois principais tipos de células do parênquima cerebral implicadas em infecções crônicas (CABRAL et al., 2016). No entanto, *in vivo*, o *T. gondii* persiste quase exclusivamente nos neurônios (BLANCHARD; DUNAY; SCHLÜTER, 2015; GOMES e BARBOSA, 2017; MENDEZ e KOSHI, 2017).

Essa infecção crônica do SNC, para a qual existem poucas terapias curativas, está subjacente à capacidade do *T. gondii* de reativar e causar a neurotoxoplasmose em indivíduos imunossuprimidos. Ou ainda, ultrapassar a barreira transplacentária resultando na toxoplasmose congênita com graves alterações cerebrais ao feto e em muitos casos à indução espontânea ao aborto (PAPAS et al., 2009). No presente estudo, mimetizamos uma infecção materno fetal por *T. gondii* através da inoculação de cistos teciduais da cepa cistogênica (VEG) em camundongos fêmeas adultas e observamos que o parasito atravessa ambas barreira hematoencefálica e transplacentária. Nossos dados demonstram que o *T. gondii* pode induzir ao aborto espontâneo em camundongas prenhes infectadas. Além disso, DNA de *Toxoplasma gondii* foi detectado através da técnica de PCR em embriões obtidos de camundongas prenhes e córtex de animais adultos infectados (Artigo 1).

Cepas da linhagem tipo III como a VEG utilizada neste estudo, possuem baixa replicação e rápido encistamento *in vivo*, o que permite reproduzir em roedores a forma de transmissão que mais prevalece em humanos (SAEJI; BOILE; BOOTHROYD, 2005). Entretanto, nenhum

estudo prévio abordou a influência da toxoplasmose congênita sobre o desenvolvimento do SNC e neurogênese de embriões. Assim, neste estudo, utilizamos o modelo de neuroesferas obtidas da zona subventricular de embriões no 13º dia de gestação como modelo experimental para a neurogênese *in vitro*.

As neuroesferas no estudo da diferenciação neural possuem características positivas, uma vez que apresentam grande capacidade de proliferação e potencial multipotente permitindo a diferenciação em células neurais ou gliais na presença de fatores de crescimento específicos (JENSEN e PARMAR, 2006). Após a extração de células do telencéfalo de embriões e posterior cultura na presença de EGF e FGF, as CPNs proliferaram em aglomerados celulares em resposta aos fatores de crescimento (TRUJILLO et al., 2009). Curiosamente, constatou-se uma expansão no tamanho das neuroesferas obtidas de embriões congenitalmente infectados. Nossa hipótese é que o *T. gondii* favorece a aglomeração celular, neste caso, neuroesferas como um mecanismo de proteção do parasito contra a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células infectadas, na tentativa de subverter a resposta imune.

Paralelamente, o *T. gondii* favoreceu a migração radial que emerge da borda da neuroesfera em comparação as células controle. A maior transição de células neuroepiteliais para as gliais radiais durante o desenvolvimento embrionário pode estar associado com o ciclo celular, o qual é responsável pelas divisões celulares simétricas ou assimétricas. Nesse sentido, as fases sub G1, G0/G1, S e G2 do ciclo celular foram avaliadas por citometria de fluxo. O *T. gondii* provocou uma parada na fase sub G1 do ciclo celular; ou seja, fase de preparação para o passo seguinte que é a síntese de proteínas e enzimas. De modo geral, as etapas do ciclo podem indiretamente refletir na proliferação de células indiferenciadas, sendo assim, o *T. gondii* diminui a capacidade proliferativa de CPNs durante a formação do SNC ao reduzir as fases S e G2/M do ciclo.

Além de reduzir a taxa de proliferação celular, observamos através do ensaio de MTT que o *T. gondii* reduz drasticamente a viabilidade mitocondrial de células indiferenciadas induzindo a apoptose. Isto, foi provavelmente a maior produção citocinas pró-inflamatórias e a formação de EROS evidenciada em células da microglia ativadas como já demonstrado por Moreira-Souza et al. (2017).

A análise por imunocitoquímica da diferenciação neural revelou que o *T. gondii* induz uma maior prevalência de células GFAP⁺ (marcador de células gliais) e nestina (marcador de CPNs) positivas em cultura de neuroesferas após sete dias de diferenciação. Os resultados apontam uma estimulação da gliogênese em detrimento da neurogênese em CPNs infectadas por *T. gondii*. De fato, durante infecção por *T. gondii*, diversos estudos destacaram a capacidade do

parasito de infectar um grande número de células da glia além de neurônios (THOMPSON et al. 2017). No entanto, estudos mostraram que *T. gondii* infecta e encista em ambos os astrócitos e neurônios (MENDEZ e KOSHI, 2017). Uma possibilidade é que tanto os glia quanto os neurônios sejam infectados *in vivo*, mas apenas as células gliais infectadas matam ou são mortos pelo parasito, deixando os neurônios como a célula hospedeira primária para a infecção persistente. Alternativamente, o *T. gondii* poderia interagir primariamente com os neurônios *in vivo*, o que significa que o *T. gondii* persiste nos neurônios, porque essas são as células com as quais o parasito interage predominantemente (BLANCHARD; DUNAY; SCHLÜTER, 2015; GOMES e BARBOSA, 2017).

Contudo, observou-se uma menor expressão de neurônios maduros (MAP2⁺) em células infectadas por *T. gondii*. Como outras características físicas, além da densidade de neurônios e micróglia distinguem esses tipos de células, levantamos a hipótese de que outros fatores neuronais, além da localização, também poderiam desempenhar um papel na exclusividade da interação parasita-neurônio. Uma possibilidade óbvia era que o tamanho ou a área de superfície dos neurônios maduros, que inclui dendritos e axônios extensos podem ser áreas de preferência para o *T. gondii*. Nossa hipótese é que essa ampla rede de processos neuronais poderia induzir o parasito a interagir e invadir neurônios maduros, em vez de neurônios imaturos. De acordo com essas hipóteses, um estudo brilhante conduzido por Cabral et al. (2016) demonstrou que independentemente da cepa infectante, os cistos de *T. gondii* são mais frequentemente encontrados em processos neuronais completos e estão comumente longe do corpo da célula. Esses dados também sugerem que o tamanho celular pode desempenhar um papel na predileção do *T. gondii* pelos neurônios e explicaria o aumento no tamanho das NPCs, como mecanismo compensatório em resposta a infecção.

Em termos de saúde humana, entender os mecanismos de transmissão, infecção e resposta imunológica são fatores chave para minimizar as formas de transmissão e contribuir com alternativas na terapia da toxoplasmose congênita. Neste estudo, objetivamos verificar os benefícios do RSV, um potente antioxidante, antiinflamatório e neuroprotetor naturalmente encontrado em uvas (BERMAN et al., 2017) sobre a neurogliogênese de CPNs infectadas congenitalmente por *T. gondii*. Assim, para elucidar os mecanismos do RSV na neuropatogênese da toxoplasmose congênita, este estudo investigou os mecanismos celulares e moleculares mediados pelo RSV sobre CPNs obtidas de embriões infectados com *T. gondii*. Diferentes concentrações de RSV (0.1-100 μ M) foram adicionadas a cultura de neuroesferas (Artigo 1). De modo geral, o RSV exerceu efeitos benéficos aumentando o número e o tamanho de neuroesferas cultivadas, assim como estimulou a migração radial das CPNs e restaurou a

taxa de migração de células infectadas nas concentrações de 1 e 10 μM . Entre as concentrações testadas, 1 μM e 10 μM de RSV foram as mais eficazes na proliferação das neuroesferas, pois quando administrado em altas concentrações (100 μM), o RSV inibiu o crescimento das neuroesferas, tornando-se provavelmente pró-oxidante.

Assim como o *T. gondii*, o RSV altera o ciclo celular, isto é, a concentração de 1 μM de RSV aumentou o número de células na fase sub G1 do ciclo celular. O RSV ainda, reduziu o número de células durante a fase G2/M operando como um estímulo para CPNs infectadas durante as fases S e G2/M, provavelmente melhorando a síntese do DNA e atuando nos pontos de *checkpoint* na etapa final do ciclo. Resultados anteriores relataram que o RSV prende a divisão celular na transição de fase S/G2 conforme observado aqui (YU et al., 2016).

Incrivelmente, o tratamento com RSV surpreendeu ao proteger as CPNs infectadas por *T. gondii* contra a apoptose restaurando a viabilidade mitocondrial (em torno de 90%) de células infectadas. As análises de citometria de fluxo e imunocitoquímica demonstraram que o RSV estimulou a diferenciação de células gliais e neurais, agindo tanto na neurogênese; ou seja, formação de novos neurônios, quanto na gliogênese, estimulação de células imunes no SNC.

Considerando a superexpressão de células GFAP⁺ procuramos determinar os mecanismos envolvidos neste esperado tropismo do *T. gondii* pelas células gliais. Nós hipotetizamos que o sistema purinérgico poderia ter um papel crítico em influenciar as interações parasita-célula no SNC. Além disso, o sistema purinérgico possui um papel essencial no desenvolvimento embrionário e na diferenciação neural, ainda mais se considerarmos a interação neurônio-glia (BURNSTOCK, 2016).

A expressão e atividade dos receptores purinérgicos foi observada em progenitores neurais e neuroesferas obtidas a partir de diferentes espécies e áreas do cérebro embrionário e adulto. Lin et al. (2007), assim como Schwindt et al. (2011) identificaram a expressão de receptores P2X e P2Y, em neuroesferas obtidas da zona subventricular de camundongos adultos e relacionaram este perfil de expressão com a proliferação celular, principalmente devido a ação dos receptores P2Y. Conforme apresentado anteriormente, o sistema purinérgico é constituído pelos nucleotídeos e nucleosídeos, enzimas e seus receptores (ZIMMERMANN 2011; BURNSTOCK 2007; 2009; 2016). A hipótese de que *T. gondii* modula a sinalização purinérgica reforçou a idéia de investigar o sistema purinérgico em CPNs obtidas de embriões infectados (Artigo 2) e em animais adultos (Artigo 3).

Em tese, as atividades das enzimas NTPDase (usando ATP como substrato) e ADA foram alteradas em CPNs infectadas por *T. gondii*. Além disso, o *T. gondii* promoveu uma maior expressão do receptor P2X7 e A_{2A} em CPNs infectadas juntamente com um aumento na

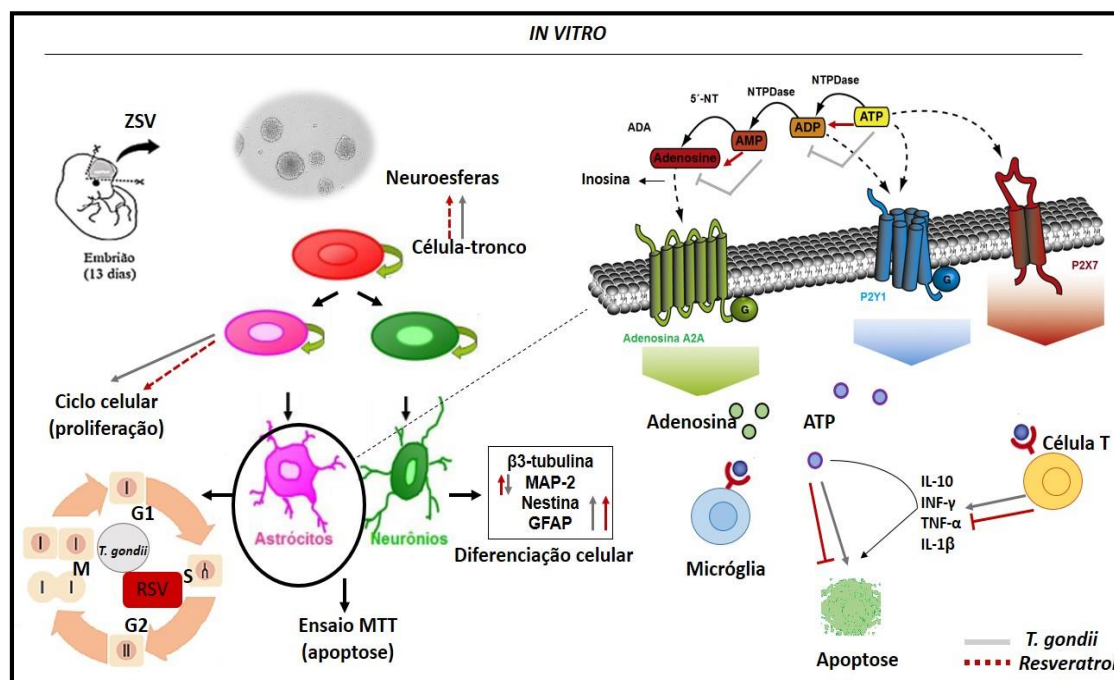
expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ e TNF- α) e antiinflamatória (artigo 2). Nossos resultados confirmam que o RSV inibiu os efeitos promovidos pelo *T. gondii* sobre as enzimas purinérgicas e também sobre os receptores P2X7 e A_{2A} modulando a produção de citocinas INF- γ , TNF- α e IL-10, que desempenham um papel central na resposta imune contra o *T. gondii*.

A *down* regulação dos receptores P2X7 e A_{2A} pelo RSV implica em menores níveis de ATP extracelular resultando em maior sobrevivência, mobilização e diferenciação das células imunes. Além disso, é bem possível que a ADO intracelular, gerada pela atividade aumentada da ADA e alteração na expressão dos receptores de adenosina suprima as respostas celulares aumentando os níveis de AMPc intracelular. Assim, ADO em altas concentrações pode atuar nos receptores A_{2A}, atenuando a inflamação e provavelmente reduzindo o dano tecidual.

O ATP extracelular e a ADO, dependendo de sua concentração e local de ação, têm ações pró e anti-inflamatórias (BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014). Quando em baixas concentrações, o ATPe tem afinidade pelos receptores P2Y, localizados na superfície da microglia (células imunes no SNC) e macrófagos. Esses receptores, quando estimulados, promovem uma regulação negativa na expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a resposta Th2 e levam à liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), promovendo um efeito protetor por serem capazes de evitar ou minimizar o dano tecidual excessivo (COUTINHO-SILVA 2007; 2009; DI VIRGILIO, 2007). Por outro lado, altos níveis de eATP se ligam ao receptor P2X7 liberando citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6, TNF- α e INF- γ .

Desta forma, findamos que o *T. gondii* induz a gliogênese em detrimento da neurogênese em CPNs. A super expressão de células da micróglia ativam uma cascata de sinalização mediada pelo ATP com alteração na atividade das ectonucleotidases e ativação do receptor P2X7, que por sua vez estimula a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias contribuindo para a inflamação no SNC. Por outro lado, o RSV protege as células do dano celular reduzindo a atividade da NTPDase e aumentando a atividade da ADA. O RSV ainda, inibe a expressão do receptor P2X7 e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 17).

Figura 17- Vias de ação moduladas pelo *T. gondii* e RSV *in vitro*. Neuroesferas extraídas do telencéfalo de embriões infectados com 13 dias de gestação proliferaram e se diferenciaram em neurônios e células glia. O *T. gondii* altera as fases do ciclo celular promovendo um aumento na taxa de proliferação de CPNs em contraste com redução na viabilidade mitocondrial (MTT). Ativação microglial expressa receptores P2X7 e A_{2A} em maior quantidade durante a infecção pelo parasito, o qual aumenta a hidrólise de ATP contribuindo para a inflamação tecidual com produção de citocinas pró e antiinflamatórias. O RSV atenua os danos teciduais provocados pelo *T. gondii* inibindo a expressão de P2X7 e reduzindo a hidrólise de ATP.



Fonte: autor

A evidência que encontramos entre as interações direta do parasito com o sistema purinérgico em córtex cerebral de animais adultos infectados e tratados com RSV é interessante (Artigo 3). Nós demonstramos um aumento na atividade da enzima NTPDase e uma redução na atividade da ADA em fêmeas adultas infectadas por *T. gondii*. Esses achados, indicam uma maior liberação de ATP extracelular pelas células. O ATP parece ligar tanto ao receptor P2X7, quanto ao receptor P2Y1 aumentando a densidade desses receptores no cérebro. Em contraste, a baixa concentração de ADO reflete na maior expressão de receptores A1 e menor expressão de receptores do tipo A_{2A} em córtex. A regulação negativa dos receptores de adenosina A1 e A_{2A} fornece um feedback positivo as células do hospedeiro. O receptor A1 é o subtipo predominante nas áreas corticais e desempenha um papel importante na neuroproteção (CUNHA, 2001).

O tratamento *in vivo* com RSV modulou a atividade das enzimas NTPDase e ADA diminuindo a densidade dos receptores P2X7, P2Y1, A1 e A_{2A} em córtex cerebral. Assim, nós

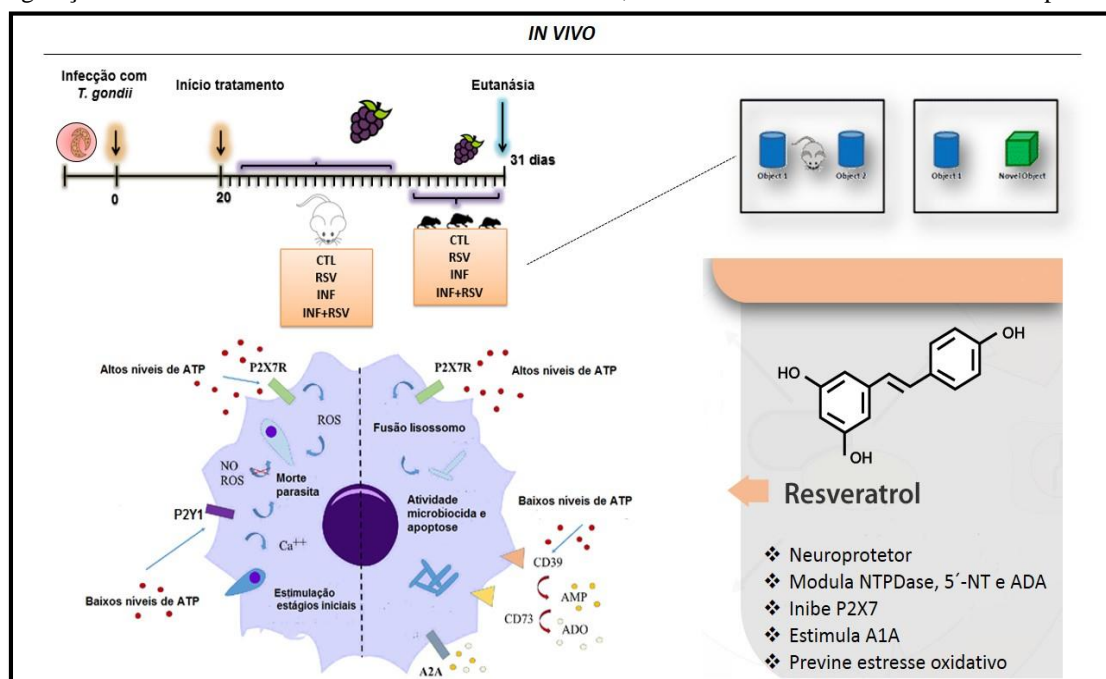
demonstramos que a ativação da cascata purinérgica poderia servir como um alvo farmacológico no tratamento da neurotoxoplasmose.

Estudos tem demonstrado que o sistema purinérgico modula não só a resposta imune contra o *T. gondii*, mas também que a ativação do receptor P2X7 contribui para a eliminação do *T. gondii* através da produção de ROS (PETIT-JENTREAU et al., 2017). Assim, nós verificamos os níveis de ROS e TBARS em córtex de animais infectados. Os resultados demonstram uma superprodução de ROS e danos à membrana em animais infectados comparado com animais saudáveis. O RSV exerceu seu efeito antioxidante restaurando os níveis de ROS e TBARS em córtex de animais infectados e tratados. Com isso, interessantemente nós mostramos que o sistema purinérgico se relaciona não apenas a produção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a resposta imune contra o parasita, mas que também à produção de ROS intracelular, o qual pode mediar a apoptose e o controle da infecção (Figura 18).

Estudos demonstraram uma relação direta em pacientes infectados por *T. gondii* à alteração obsessiva compulsiva (COOK et al. 2015), depressão (GALE et al., 2014), comportamento suicida (LESTER, 2010) e até mesmo esquizofrenia (TORREY; BARTKO; YOLKEN, 2012). Estes estudos experimentais revelaram que os mecanismos de transmissão e intensidade das lesões, resultantes da toxoplasmose, estão associados a alterações comportamentais do hospedeiro frente ao parasito (SUGDEN et al., 2016). Além disso, estudos demonstraram que algumas regiões cerebrais exibiram maior densidade e número de cistos teciduais do que outras tais como: regiões parietal e frontal (bulbo olfatório, o córtex entorrinal e córtex somatossensorial), hipocampo e amígdala, áreas que estão diretamente envolvidas no controle de comportamento de defesa e processamento de emoções (BERENREITEROVÁ et al., 2011). Sabendo que a toxoplasmose é capaz de ocasionar mudanças emocionais, de personalidade e alterações nos níveis de inteligência, isso nos motivou a investigar se recém-nascidos infectados congenitalmente por *T. gondii* apresentariam alterações comportamentais. Tal constatação revelou que camundongos recém-nascidos infectados com *T. gondii* exploraram menos vezes os braços abertos no teste de cruz elevada demonstrando um efeito depressivo. A ausência de resultados estatisticamente significativos no modelo de *Open Field* excluem o efeito ansiolítico por repressão ou indução locomotora dos animais em estudo. A memória exploratória também foi avaliada nos animais e os resultados demonstraram uma redução significativa da memória a curto e longo prazo nos recém-nascidos infectados por *T. gondii*. O tratamento com RSV em recém-nascidos infectados parece ter efeito neuroprotetor restaurando a atividade exploratória nos animais infectados.

Idêntico ao que foi mostrado na cultura de células, descobrimos que ao longo da infecção cerebral crônica, o *T. gondii* interage com os neurônios, e células gliais. Essa predileção neuronal persiste mesmo em circunstâncias altamente manipuladas, como a introdução de parasitas no cérebro via transmissão materno-fetal. Assim, trabalhos futuros serão focados em mostrar a neurogênese *in vivo*, o que contribuirá para o entendimento das alterações comportamentais evidenciadas.

Figura 18 – Sinalização purinérgica e alterações comportamentais *in vivo* moduladas pelo *T. gondii* e RSV. O *T. gondii* provoca alterações comportamentais em camundongos recém-nascidos. Em camundongos fêmeas adultas, o parasito ativa macrófagos e células gliais; e aumenta a densidade dos receptores P2X7, P2Y1, A1 e A_{2A}. Em células imunes ativadas, a hidrólise do ATP e os níveis de ADO são regulados pelas enzimas NTPDase, 5'-NT e ADA. Altos níveis de ATP ligam-se a receptores do tipo P2X7, que induz uma cascata de sinalizações mediada por ROS a fim de promover a apoptose celular. Em contrapartida, baixos níveis de ATP, ligam-se a receptores P2Y1 que induz a morte direta do parasita. O tratamento *in vivo* com RSV demonstra exercer atividade microbicida através da regulação dos níveis de ATP e ADO via NTPDase e ADA, além de diminuir a densidade dos receptores.



Fonte: autor

De modo geral, esta tese forneceu evidências para o melhor entendimento da participação do *T. gondii* na diferenciação neural. Além disso, mesmo sem o foco nas vias de sinalização atuantes, descrevemos um importante papel do RSV na gliogênese e neurogênese, adicional a sua clássica ação no controle da inflamação. Com isso, pretende-se encorajar novas pesquisas acerca da compreensão dos mecanismos moleculares que permeiam a inter-relação entre os

diversos sistemas de neurotransmissão e ampliar as possibilidades de estudo para o papel do RSV como um componente favorecedor da diferenciação neural.

Contudo, nós demonstramos que o RSV pode ser utilizado como terapia restorativa tanto para o tratamento da toxoplasmose congênita, já que reverte as alterações comportamentais provocadas pelo parasito, quanto na neurotoxoplasmose que age como um neuroprotetor evitando a produção de espécies reativas e ao dano lipídico de membranas exacerbados. Portanto, conclui-se que este estudo revela alguns mecanismos neuroprotetores do RSV sobre prejuízos cognitivos e danos oxidativos no cérebro de camundongos recém-nascidos e adultos. Nós demonstramos que o *T. gondii* desencadeia uma cascata purinérgica nas células do hospedeiro como um mecanismo compensatório para evitar danos celulares e indiretamente modula a produção de citocinas. Assim, a compreensão do papel desempenhado pela sinalização purinérgica na toxoplasmose se torna uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a toxoplasmose. Juntos, os resultados revelam o RSV como uma molécula restaurativa para o tratamento da neurotoxoplasmose.

5. CONCLUSÕES

Em resumo, este estudo permitiu verificar:

- 1) O parasito *T. gondii* aumenta a taxa de proliferação, migração, morte e destino neural de CPNs obtidas do telencéfalo de embriões infectados modulando diretamente a neurogênese. Por outro lado, o tratamento com RSV restaurou a neurogliogênese ao favorecer a migração celular e prevenir a apoptose de CPNs infectadas este efeito foi dependente da concentração de RSV utilizada.
- 2) A infecção por *T. gondii* promoveu a gliogênese; ou seja, ativação de células imune, em detrimento da neurogênese (formação de novos neurônios). O tratamento com RSV modulou positivamente a neurogliogênese de CPNs infectadas; isto é, promovendo maior expressão de neurônios maduros com sinapses funcionais e sinalizando às células da micróglia a reagir contra a infecção.
- 3) O *T. gondii* provocou uma parada na fase Sub G1 indicando maior proliferação de células indiferenciadas durante a infecção e reduziu as fases S e G2/M do ciclo celular sugerindo necessidade maior de reparo ao DNA e proteínas. Em contrapartida, o RSV modulou a parada do ciclo atuando nas fases S e G2/M do ciclo, indicando que o RSV favorece neuroproteção e neuromodulação na situação de infecção.
- 4) CPNs infectadas com *T. gondii* apresentaram alterações na atividade das enzimas NTPDase e ADA, sugerindo maior hidrólise de ATP que atua como facilitador da apoptose e altos níveis de ADO que induzem o recrutamento células imune ao local inflamado. O tratamento com RSV restaurou a atividade das enzimas em CPNs infectadas sugerindo uma importante molécula inibidora na sinalização purinérgica induzida por *T. gondii*.
- 5) O *T. gondii* induziu uma super expressão dos receptores P2X7 e A_{2A}, responsáveis pelo controle da replicação do parasito e dano tecidual respectivamente, em cultura de neuroesferas. Tendo em vista o papel neuromodulador do RSV na via purinérgica, o RSV inibiu a expressão de P2X7, mas não de A_{2A} em CPNs infectadas indicando que o RSV exerce efeitos benéfico no controle da apoptose celular via ATP.
- 6) Um aumento na expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias foram ativadas pelo parasito fortalecendo a resposta imune ente parasito-hospedeiro em cultura.
- 7) Da mesma forma, o RSV exerceu efeitos anti-inflamatórios ao reduzir os níveis de citocinas indicando diminuir a inflamação no SNC.

- 8) O parasito provocou alterações nas enzimas NTPDase, 5'-NT e ADA em córtex de animais adultos demonstrando ativação da cascata de enzimas purinérgicas *in vivo*. O tratamento *in vivo* com RSV restaurou a hidrólise de ATP, AMP e ADO em córtex cerebral sugerindo o RSV como alvo terapêutico no controle da infecção regulando a hidrólise de ATP e ADO extracelulares.
- 9) Um aumento da densidade dos receptores P2X7, P2Y₁ e A1 e redução na densidade do receptor A_{2A} ocorreram em córtex de animais adultos infectados, fortalecendo o envolvimento do sistema purinérgico durante infecção por *T. gondii*. O tratamento com RSV inibiu a ativação dos receptores analisados indicando o resveratrol como um antagonista de receptores do tipo P1 e P2.
- 10) Danos oxidativos foram observados em córtex cerebral através do aumento nos níveis de ROS e TBARS em animais adultos infectados com *T. gondii*; sugerindo que quando associado à infecção refletem em alterações comportamentais e enzimáticas em nível de SNC. O RSV agiu como molécula anti-oxidante, como esperado, reduzindo os níveis de ROS e TBARS durante infecção crônica por *T. gondii*, podendo ser um alvo terapêutico na neurotoxoplasmose.
- 11) O RSV provou ser um importante neuroprotetor mediando a neurogliogênese de CPNs e exerceu um efeito inibitório via sistema purinérgico podendo ser utilizado como alvo terapêutico no tratamento da toxoplasmose congênita como também na neurotoxoplasmose.

6. PERSPECTIVAS

Em conjunto, os dados apresentados nesta tese favoreceram o entendimento da neurogênese durante uma infecção congênita por *T. gondii* e estabeleceram uma nova relação parasito-hospedeiro mediado pelo sistema purinérgico. Além disso, demonstramos os efeitos neuroprotetores do RSV como uma molécula restauradora da neurogliogênese induzida por *T. gondii* e sugerimos o RSV como um alvo terapêutico para o tratamento da neurotoxoplasmose; uma vez que o RSV atua diminuindo a atividade das enzimas purinérgicas e inibindo a expressão de receptores, especialmente P2X7, A1 e A_{2A}. Nesse contexto, temos como perspectivas futuras analisar a neurogênese hipocampal *in vivo* e estabelecer uma ligação entre alterações comportamentais e sistema purinérgico. Ainda, do ponto de vista prático esperamos futuramente verificar os efeitos do RSV em ensaios clínicos introduzindo este composto natural na dieta de pacientes acometidos pela toxoplasmose.

7. REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M.P.; CERUTI, S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. **Purinergic Signal**, v. 2, p. 595-604, 2006.
- ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRASTSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neuroscience**, v. 32, n.1, p. 19-29, 2009.
- ABDEL-ALEEM, G. A.; KHALEEL, E. F.; MOSTAFA, D. G.; ELBERIER, L. K. Neuroprotective effect of resveratrol against brain ischemia reperfusion injury in rats entails reduction of DJ-1 protein expression and activation of PI3K/Akt/GSK3b survival pathway. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 122, n.4, p. 200–213, 2016.
- ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, v.135, p.1127–1128, 1962.
- ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. **Anat Rec**, v. 145, p. 573–591, 1963.
- ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**, v. 124, p.319–335, 1965.
- ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **J Comp Neurol**, v. 128, p.431–474, 1966.
- ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J Comp Neurol**, v. 137, p. 433–458, 1969.
- ANACKER, C.; HEN R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, p.335–346, 2017.
- ANDRABI, S.A.; SPINA, M.G.; LORENZ, P.; EBMEYER, U.; WOLF, G.; HORN, T.F. Oxyresveratrol (trans-2,30 ,4,50 -tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. **Brain Res**. v. 1017, n. 98e107, 2004.
- ANTCZAK, M.; DZITKO, K.; DŁUGOŃSKA, H. Human toxoplasmosis—Searching for novel chemotherapeutics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 677–684, 2016.
- ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E. S.; HASKÓ, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends Mol Med**, v. 19, p. 355–367, 2013.

- BALDWIN, J.M. Structure and function of receptors coupled to G proteins. **Curr Opin Cell Biol**, v. 6, p. 180–190, 1994.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiology**, v.11, n.9, p. 426-30, 2003.
- BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J Clin Invest**, v. 118, p. 413-420, 2008.
- BASTIANETTO, S.; MÉNARD, C.; QUIRION, R. Neuroprotective action of resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1195–1201, 2015.
- BAUR, A.J.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews**, v. 500, n.6, p.493–506, 2006.
- BERENREITEROVÁ, M.; FLEGR, J.; KUBĚNA, A.A.; NĚMEC, P. The Distribution of *Toxoplasma gondii* Cysts in the Brain of a Mouse with Latent Toxoplasmosis: Implications for the Behavioral Manipulation Hypothesis. **PLoS ONE**, v.6, n.12, p. e28925, 2011.
- BERMAN, A.Y.; MOTECHIN, R.A.; WIESENFELD, M.Y.; HOLZ, M.K. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 35, 2017.
- BIBER, K.; KLOTZ, K.N.; BERGER, M.; GEBICKE-HARTER, P.J.; VAN CALKER, D. Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. **J Neurosci**, v. 17, p. 4956–4964, 1997.
- BIEDERBICK, A.; KOSAN, C.; KUNZ, J.; ELSÄSSER, H.P. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **J Biol Chem**, v.; 275, p. 19018-19024, 2000.
- BI, X.L.; YANG, J.Y.; DONG, Y.X.; WANG, J.M.; CUI, Y.H.; IKESHIMA, T.; ZHAO, Y.Q.; WU, C.F. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia, **Int. Immunopharmacol**, v. 5, p. 185–193, 2005.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3. p. 607–623, 2000.
- BLADER, I.J.; COLEMAN, B.I.; CHEN, C.T.; GUBBELS, M.J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. **Annual Review of Microbiology**, v.69, p. 463-485, 2015.
- BLANCHARD, N.; DUNAY, I.R.; SCHLÜTER, D. Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: a fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system. **Parasite Immunology**, v. 37, n.3, p. 150–158, 2015.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. **Nutrients**, v.8, n.5, p. 250, 2016.

- BOSKA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.24, n.6, p.881-97, 2010.
- BOTTARI, N.B.; BALDISSERA, M.D.; TONIN, A.A.; RECH, V.C.; NISHIHARA, V.S.; THOMÉ, G.R.; CAMILLO, G.; VOGEL, F.F.; DUARTE, M.M.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; TOCHETTO, C.; FIGHERA, R.; DA SILVA, A.S. Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim associated to resveratrol on its free form and complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on cytokines levels of mice infected by *Toxoplasma gondii*. **Microb Pathog**, v. 87, p. 40–44, 2015a.
- BOTTARI, N.B.; BALDISSERA, M.D.; TONIN, A.A.; RECH, V.C.; NISHIHARA, V.S.; THOMÉ, G.R.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; CAMILLO, G.; VOGEL, F.F.; TOCHETTO, C.; FIGHERA, R.; MACHADO, G.; STEFANI, L.M.; DA SILVA, A.S. Sulfamethoxazole-trimethoprim associated with resveratrol for the treatment of toxoplasmosis in mice: Influence on the activity of enzymes involved in brain neurotransmission. **Microbial Pathogenesis**, v. 79, p.17-23, 2015b.
- BRAKE, A.J.; WAGENBACH, M.J.; JULIUS, D. **New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor.** **Nature**, v.371, p.519-523, 1994.
- BRAUN, N.; SEVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; ENJOJI, K.; GUCKELBERGER, O.; HAMMER, K.; DI VIRGILIO, F.; ZIMMERMANN, H. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 4357–4366, 2000.
- BRAUTIGAM, V.M.; FRAISER, C.; MIKODEMOVA, M.; WATTERS, J.J. Purinergic receptor modulation of BV-2 microglial cell activity: potential involvement of p38 MAP kinase and CREB. **J Neuroimmunol**, v. 166, n.1–2, p.113–125, 2005.
- BRUEL-JUNGERMAN, E.; LUCASSEN, P.J.; FRANCIS, F. Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 379-388, 2011.
- BUFFOLANO, W.; BEGHETTO, E.; DEL PEZZO, M.; SPADONI, A.; DI CRISTINA, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N. Use Of Recombinant Antigens For Early Postnatal Diagnosis Of Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.12, p. 5916 – 5924, 2005.
- BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. **J Theor Biol.** v. 62, p. 491-503, 1976.
- BURNSTOCK, G.E. Knight Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int. Rev. Cytol**, v. 240, p. 31-304, 2004.
- BURNSTOCK, G. Cotransmission. **Curr Opin Pharmacol**, v.4, p. 47-52, 2004.

- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci.** v.12, p. 1471-1483, 2007.
- BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. **Acta Physiol (Oxf).** v.195, p. 415-44, 2009.
- BURNSTOCK, G. Purinergic cotransmission. **Exp Physiol.** v.94, p. 20-24, 2009.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v.10, p. 529, 2014.
- BURNSTOCK, G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 4-17, 2016.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, p.364–373, 2018.
- CABRAL, C.M.; TULADHAR, S.; DIETRICH, H.K.; NGUYEN, E.; MACDONALD, W.R.; TRIVEDI, T.; DEVINENI, A.; KOSHY, A.A. Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog**, v. 12, n.2, p. e1005447, 2016.
- CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies Against SAG1-Related Sequence, SAG2A, And P97 Antigens From *Toxoplasma gondii* To Detect Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, And IgA Antibodies In Human Sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n.8, p. 1265 – 1271, 2008.
- CHARLES, E.; CALLEGAN, M. C.; BLADER, I. J. The SAG1 *Toxoplasma gondii* surface protein is not required for acute ocular toxoplasmosis in mice. **Infection and immunity**, v. 75, n.4, p. 2079 – 2083, 2007.
- CHEN, Y.;CORRIDEN, R.; INOUE, Y.; YIP, L.; HASHIGUCHI, N.; ZINKERNAGEL, A.; NIZET, V.; INSEL, P.A.; JUNGER, W.G. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. **Science**, v. 314, p.1792-1795, 2006.
- COCKCROFT, S.; GOMPERTS, B.D. The ATP4- receptor of rat mast cells. **Biochem. J.** v. 188, p. 789-798, 1980.
- COOK T.B.; BRENNER L.A.; CLONINGER C.R.; LANGENBERG P.; IGBIDE A.; GIEGLING I.; HARTMANN, A.M.; KONTE, B.; FRIEDL, M.; BRUNDIN, L.; GROER, M.W.; CAN, A.; RUJESCU, D.; POSTOLACHE, T.T. "Latent" infection with *Toxoplasma gondii*: association with trait aggression and impulsivity in healthy adults. **J Psychiatr Res**, v. 60, p. 87–94, 2015.

- CORRÊA, G.; MARQUES DA SILVA, C.; DE ABREU MOREIRA-SOUZA, A.C.; VOMMARO, R.C.; COUTINHO-SILVA, R. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes Infect**, v. 12, p.497–504, 2010.
- CORRÊA, G.; LINDENBERG, A.; FERNANDES-SANTOS, C.; GANDINI, C.; PETITINGA PAIVA, M.; COUTINHO-SILVA, R.; KUBELKA, C.F. The purinergic receptor P2X7 role in control of Dengue virus-2 infection and cytokine/chemokine production in infected human monocytes. **Immunobiology**, v.221, n. 7, p. 794–802, 2016.
- COUTINHO-SILVA, R.; MONTEIRO DA CRUZ, C.; PERSECHINI, P.M.; OJCIUS, D.M. The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. **Purinergic Signal**, v. 3, p.83–90, 2007.
- COUTINHO-SILVA, R.; CORRÊA, G.; SATER, A.A.; OJCIUS, D.M. The P2X7 receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. **Purinergic Signal**, v. 5, p. 197–204, 2009.
- CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int**, v. 38, p. 107–125, 2001.
- CVEJIC, J.M.; DJEKIC, S.V.; PETROVIC, A.V.; ATANACKOVIC, M.T.; JOVIC, S.M.; BRCESKI, I.D.; GOJKOVIC-BUKARICA, L.C. Determination of trans- and cis-resveratrol in Serbian commercial wines. **J Chromatogr Sci**, v. 48, p. 229–34, 2010.
- DAHLQUIST, R.; DIAMANT, B. Further observations on ATP-induced histamine release from rat mast cells. **Acta Pharmacol. Toxicol (Copenh.)**, v. 28, p. 43, 1970.
- DAS, S.; BASU, A. Inflammation: A new candidate in modulating adult neurogenesis. **J Neurosc Research**, v. 86, n. 1, p. 1199–1208, 2008.
- DAS, S.; DAS, D.K. Anti-inflammatory responses of resveratrol, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, v. 6, p. 168–173, 2007.
- DE LA LASTRA, C.A.; VILLEGAS I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging 450 agent: mechanisms and clinical implications, **Mol Nutr Food Res**. v.49, n. 451, p. 405–430, 2005.
- DEAGLIO, S.; DWYER, K.M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A.; ERAT, A.; CHEN, J.F.; ENJYOJI, K.; LINDEN, J.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K.; STROM, T.B.; ROBSON, S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **J Exp Med**, v.204, p. 1257–1265, 2007.
- DEHAY, C.; KENNEDY, H. Cell-cycle control and cortical development. **Nature Reviews Neuroscience**, v.8, p. 438–450, 2007.

- DEUTCH A.Y. Chapter 6 – **Neurotransmitters**. *Fundamental Neuroscience (Fourth Edition)* p. 117-138, 2013.
- DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J.M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O.R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, p. 587–600, 2001.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 2005.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. **Purinergic Signal**, v. 3, p.1–3, 2007.
- DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, p. 117-123, 2015.
- DUBEY, J. P. **Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii***. *International Journal of Parasitology*, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.
- DUAN, X.; KANG, E.; LIU, C.Y.; MING, G.L., SONG,H. Development of neural stem cell in the adult brain. **Curr Opin Neurobiol**, v. 18, p. 108-15, 2008.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. **Boca Raton**, v. 2, p. 313, 2012
- DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375–1424, 2012.
- DUBEY, J.P. **Chapter 1 - The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii***. In: *Toxoplasma Gondii (Second Edition)*. The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods, p. 1-17, 2014.
- DUBOIS-COLAS, N.; PETIT-JENTREAU, L.; BARREIRO, L. B.; DURAND, S.; SOUBIGOU, G.; LECOINTE, C.; KLIBI, J.; REZAÏ, K.; LOKIEC, F.; COPPÉE, J.Y.; GICQUEL, B.; TAILLEUX, L. Extracellular adenosine triphosphate affects the response of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis**, v. 210, p. 824–833, 2014.
- DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n.1, p. 31-55, 2001.
- DUQUE T.L.A; SOUTO, X.M.; ANDRADE-NETO, V.V.; ENNES-VIDAL, V.; MENNA-BARRETO, R.F.S. **Autophagic Balance Between Mammals and Protozoa: A Molecular, Biochemical and Morphological Review of Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections**, In: INTEC, 2013.
- ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further healthy promotion action. **Public Health**, v. 122, n.4, p. 335–353, 2008.

- FABRIS, S.; MOMO, F.; RAVAGNAN, G.; STEVANATO, R. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. **Biophysical Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 76–83, 2008.
- FAIGLE, R.; SONG, H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 2, p. 2435-2448, 2013.
- FERRARI, D.; VILLALBA, M.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; DI VIRGILIO, F. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. **J Immunol**, v. 156, p.1531-1539, 1996.
- FERRARI, D.; WESSELBORG, S.; BAUER, M.K.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. **J Cell Biol**, v. 139, n.7, p.1635–1643, 1997.
- FERREIRA, A. M.; Vitor, R.W.; Carneiro, A.C.; Brandão, G.P.; Melo, M.N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). **Infection Genetics Evolution Journal**, v.4, p. 131-142, 2004.
- FIELDS, R.D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nat Rev Neurosci**, v.7, p.423-436, 2006.
- FREDHOLM, B.B.; CHEN, J.F.; CUNHA, R.A.; SVENNINGSSON, P.; VAUGEOIS, J.M., Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**, v. 63, p. 191-270, 2005.
- FREDHOLM, B.B.; AP, I.J.; JACOBSON, K.A.; LINDEN, J.; MULLER, C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—An update. **Pharmacol Rev**, v. 63, p. 1–34, 2011.
- FREEMAN, W.H.; BRACEGIRDLE, B. **An Atlas of Embriology**. 3^a Ed. Reprinted London: Heinemann Educational Books. p.109, 1982.
- FRENKEL, J. K. **Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology**. In: The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera. University Park Press. p. 343-4101, 1973.
- GALE, S.D.; BROWN, B.L.; BERRETT, A.; ERICKSON, L.D.; HEDGES, D.W. Association between latent toxoplasmosis and major depression, generalised anxiety disorder and panic disorder in human adults. **Folia Parasitol (Praha)**, v. 61, n.4, p. p. 285–292, 2014.
- GATSON, J.W.; LIU, M.M.; ABDELFATTAH, K.; WIGGINTON, J.G.; SMITH, S.; WOLF, S.; MINEI, J.P. Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury. **J. Trauma Acute Care Surg**, v. 74, n. 470e474, 2013.

- GEBICKE-HAERTER, P.J.; CHRISTOFFEL, F.; TIMMER, J.; NORTHOFF, H.; BERGER, M.; VAN CALKER, D. Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. **Neurochem Int**, v. 29, n.1, p. 37–42, 1996.
- GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 6ed. Sinauer Associates: Sunderland, 2000.
- GOMES, A. F.; BARBOSA, H. S. Congenital Toxoplasmosis: In Vivo Impact of *Toxoplasma gondii* Infection on Myogenesis and Neurogenesis. **Toxoplasmosis**. v.68619, 2017.
- GOMES, C. V.; KASTER, M. P.; TOMÉ, A. R.; AGOSTINHO, P. M.; CUNHA, R. A. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n.5, p. 1380–1399, 2011.
- GONG, Q.-H.; WANG, Q.; SHI, J.-S.; HUANG, X.-N.; LIU, Q.; MA, H. Inhibition of caspases and intracellular free Ca²⁺ concentrations are involved in resveratrol protection against apoptosis in rat primary neuron cultures. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 28, n. 1724e1730, 2007.
- GÖTZ, M.; HUTTNER, W.B. The cell biology of neurogenesis. **Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 777-788, 2005
- GRIGG, M.E.; DUB EY, J.P.; NUSSENBLATT, R.B. Ocular Toxoplasmosis: Lessons From Brazil. **American Journal of ophthalmology**, v.159,n. 6, p. 999–1001, 2015.
- GRIMM, I.; ULLSPERGER, S.N.; ZIMMERMANN, H. Nucleotides and epidermal growth factor induce parallel cytoskeletal rearrangements and migration in cultured adult murine neural stem cells. **Acta Physiologic**, v.199, n.2, p. 181-189, 2010.
- GRUJIC, J.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; NIKOLIĆ, A.; KLUN, I.; BOBIĆ, B. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, n.3, p. 226-230, 2005.
- HAMMARBERG, C.; SCHULTE, G.; FREDHOLM, B.B. Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. **J Neurochem**, v.86, n.4, p. 1051–1054, 2003.
- HASKÓ, G.; KUHEL, D.G.; NÉMETH, Z.H.; MABLEY, J.G.; STACHLEWITZ, R.F.; VIRÁG, L.; LOHINAI, Z.; SOUTHAN, G.J.; SALZMAN, A.L.; SZABÓ, C. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. **J Immunol**. v.164, p. 1013-1019, 2000.
- HEYNEKAMP, J.J.; WEBER, W.M.; HUNSAKER, L.A.; GONZALES, A.M.; ORLANDO, R.A.; DECK, L.M.; VANDER JAGT, D.L. Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappaB. **J. Med. Chem.** v.49, n. 7182e718, 2006.

- HILL, D.E.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*. In: Ortega Y., Sterling C. (eds) Foodborne Parasites. Food Microbiology and Food Safety. Springer, Cham, 2018.
- HOL, E.M.; PEKONY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 32, p. 121-130, 2015.
- HOLEC-GAŞIÖR, L.; KUR, J. *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. **Experimental Parasitology**, v. 124, n.3, p. 272 – 278, 2010.
- HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. **J Physiol**, v. 145, n.3, p.494-504,1959.
- HOU, B.; BENSON, A.; KUZMICH, L.; DEFRANCO,A.L.; YAROVINSKY, F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n.1, p. 278 –283, 2011.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.
- HUANG, S.W.; WALKER, C.; PENNOCK, J.; ELSE, K.; MULLER, W.; DANIELS, M. J.; PELLEGRINI, C.; BROUGH, D.; LOPEZ-CASTEJON, G.; CRUICKSHANK, S.M.P2X7 receptor-dependent tuning of gut epithelial responses to infection. **Immunol Cell Biol**, v. 95, p. 178–188, 2016.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B.F.; SBAGHI, M. Analysis of resveratrol in burgundy wines. **J Wine Res**, v.4, p. 79–85, 1993.
- JENSEN, J.B.; PARMAR M. Strengths and limitations of the neurosphere culture system. **Mol Neurobiol**, v. 34, p. 153, 2006.
- JIANG, T.; GONG, D.; MA, L. A.; NIE, H.; ZHOU, Y.; YAO, B.; ZHAO, J. Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in swines. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 51 – 56, 2008.
- JONGERT, E.; VERHELST, D.; ABADY, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N., 2008. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein–protein vaccine combination but not by its DNA–protein counterpart. **Vaccine**, v. 26, p. 5289 – 5295, 2008.
- KAPLAN, M.S; HINDS, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science**, v. 197, p.1092–1094, 1977.

- KAPLAN, M.S. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. **J Comp Neurol**, v. 195, p.323–338, 1981.
- KAPLAN, M.S. Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electron microscopic and morphometric analysis. **Ann NY Acad Sci**, v. 457, p.173–192, 1985.
- KAPLAN, J.E.; BENSON, C.; HOLMES, K.K.; BROOKS, J.T.; PAU, A.; MASUR, H. Centers for Disease Control Prevention (CDC), National Institutes of Health, HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **MMWR Recomm**, v.58, n.4, p.1–207, 2009.
- KASHFI, S.; GHAEDI, K.; BAHARVAND, H; NASR-ESFAHANI, M.H.; JAVAN, M.. A1 Adenosine Receptor Activation Modulates Central Nervous System Development and Repair. **Mol Neurobiol**, v.54, p. 8128, 2017.
- KATZUNG, B.C. **Farmacologia Básica e clínica**. ed 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 546-554, 2006.
- KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 3, n. 386, p.493-5, 1997.
- KEMPERMANN, G. **Adult Neurogenesis**: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. USA: 2ed Oxford University Press; 2010.
- KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.7:a018812, 2015.
- KHAKH, B.S.; NORTH, R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, v. 442, p. 527-532, 2006.
- KHAN, A.; DUBEY, J.P.; SU, C.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, LD. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645-655, 2011.
- KHAN, K.; KHAN, W. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. **Parasitology International**, v. 67, p. 715–721, 2018.
- KING, R.E.; BOMSER, J.A.; MIN, D.B. Bioactivity of resveratrol. **Comprehensives reviews in Food Science and Food Safety**, v.5, n.3, p. 65-70, 2006.
- KO, J.H.; SETHI, G.; UM, J.Y.; SHANMUGAM, M.K.; ARFUSO, F.; KUMAR, A.P.; BISHAYEE, A.; AHN, K.S. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 2589, 2017.

- KOCH, I.; POLJAC, E.; MÜLLER, H.; KIESEL, A. Cognitive structure, flexibility, and plasticity in human multitasking—An integrative review of dual-task and task-switching research. **Psychological Bulletin**, v. 144, n.6, p. 557-583, 2018.
- KODYM, P.; MALÝ, M.; BERAN, O.; JILICH, D.; ROZSYPAL, H.; MACHALA, L.; HOLUB, M. Incidence, immunological and clinical characteristics of reactivation of latent *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n.3, p. 600-607, 2015.
- KOEHL, M. Gene-environment interaction in programming hippocampal plasticity: focus on adult neurogenesis. **Front Mol Neurosci**, v. 8, p. 41, 2015.
- KOIZUMI, S.; OHSAWA, K.; INOUE, K.; KOHSAKA, S. Purinergic receptors in microglia: Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. **Glia**, v. 61, n. 1, 47-54, 2013.
- KRISHNAMURTHY, S.; KONSTANTINOOU, E.K.; YOUNG, L.H.; GOLD, D.A.; SAEIJ, J.P.J. The human immune response to *Toxoplasma*: Autophagy versus cell death. **PLoS Pathog**, v. 13, n.3, p. e1006176, 2017.
- KUMAR, V.; PANDEY, A.; JAHAN, S.; SHUKLA, R.K.; KUMAR, D.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, S.; RAJPUROHIT, C.S.; YADAV, S.; KHANNA, V.K.; PANT, A.B. Differential responses of Trans-Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. **Sci Rep**, v. 6, n. 28142, 2016.
- LA SALA, A.; CORRIDEN, R.; INOUE, Y.; YIP, L.; HASHIGUCHI, N.; ZINKERNAGEL, A.; NIZET, V.; INSEL, P.A.; JUNGER, W.G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **J Leukoc Biol**, v. 73, p. 339-343, 2003.
- LALO, U.; PANKRATOV, Y.; WICHERT, S.P.; ROSSNER, M.J.; NORTH, R.A.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. **J Neurosci**, v. 28, p. 5473-5480, 2008.
- LATEK, D.; MODZELEWSKA, A.; TRZASKOWSKI, B.; PALCZEWSKI, K.; FILIPEK, S. G protein-coupled receptors—recent advances. **Acta Biochim Pol**, v. 59, n.4, p.515–529, 2012.
- LATIN, S.; PEDATA F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **J. Neurochem**.v.79, n.3, p.463-484, 2001.
- LEE, M.H.; THOMAS, J.L.; WANG, H.Y.; CHANG, C.C.; LIN, C.C.; LIN, H.Y. Extraction of resveratrol from polygonum cuspidatum with magnetic orcinol-imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) composite particles and their in vitro suppression of human osteogenic sarcoma (HOS) cell line. **J Mater Chem**, v. 22, p. 24644-51, 2012.

- LEES, M.P.; FULLER, S.J.; MCLEOD, R.; BOULTER, N.R.; MILLER, C.M.; ZAKRZEWSKI, A.M.; MUI, E.J.; WITOLA, W.H.; COYNE, J.J.; HARGRAVE, A.C.; JAMIESON, S.E.; BLACKWELL, J.M.; WILEY, J.S.; SMITH, N.C. P2X7 Receptor-Mediated Killing of an Intracellular Parasite, *Toxoplasma gondii*, by Human and Murine Macrophages. **The Journal of Immunology**, v.201, n.6, p. 7040-6, 2010.
- LÉGER, L.; DUBOSCQ, O. Selenococcidium intermedium Leg. et Dub. et la systematiques des sporozoaires. **Archives de zoologie expérimentale et générale**, v. 5, p. 187-238, 1910.
- LÉGER, L. *Caryospora simplex*, coccidie monosporee et la classification des coccidies. *Archives in Protistenk*, v. 22, p. 71-86, 1911.
- LESTER, D. Brain parasites and suicide. **Psychol Rep**, v.107, n.2, p. 424, 2010.
- LEVINE, N. D. Taxonomy of the Sporozoa. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 208-209, 1970.
- LI, G.; WANG, G.; SHI, J.; XIE, X.; FEI, N.; CHEN, L.; XU, Y. trans -Resveratrol ameliorates anxiety-like behaviors and fear memory deficits in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Neuropharmacology**, v. 133, p. 181–188, 2018.
- LIN, J.H.C.; TAKANO, T.; ARCUINO, G.; WANG, X.; HU, F.; DARZYNKIEWICZ Z.; NUNES, M.; GOLDMAN, S.A.; NEDERGAARD, M. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. **Developmental Biology**, v. 302, n.1, p. 356-366, 2007.
- LINDSEY, B.W.; HALL, Z.J.; HEUZÉ, A.; JOLY, J.S.;TROPEPE, V.; KASLIN, J. The role of neuro-epithelial-like and radial-glial stem and progenitor cells in development, plasticity, and repair. **Progress in Neurobiology**, v. 17, p.30185-5, 2018.
- LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; GUIDI, G.C. Red wine and cardiovascular health: the “French paradox” revisited. **Int J Red wine**, v. 2, p. 1—7, 2010.
- LIU, Q.; GAO, S.; JIANG, L.; SHANG, L.; MEN, J.; WANG, Z.; ZHAI, Y.; XIA, Z.; HU, R.; ZHANG, X.; ZHU, X. Q. A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1355 – 1362, 2008.
- LIU, C.; SHI, Z.; FAN, L.; ZHANG, C.; WANG, K.; WANG, B. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. **Brain Res.** 1374, 100e109, 2011.
- LIU, J.; REEVES, C.; JACQUES T.; MCEVOY, A.; MISEROCCHI, A.; THOMPSON, P.; SISODIYA, S.; THOM, M. Nestin-expressing cell types in the temporal lobe and hippocampus: Morphology, differentiation, and proliferative capacity. **Glia**, v. 66, n. 1., p. 62-77, 2018.

- LOPES, F.M.R.; GONÇALVES, D.D.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **Brazilian Journal of Infection Diseases**, v.11, n.5, 2007.
- LOPEZ, M. S.; DEMPSEY, R. J.; VEMUGANTI, R. Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury. **Neurochemistry International**, v.89, p. 75–82, 2015.
- MACHALA, L.; MALÝ, M.; BERAN, O.; JILICH, D.; KODYM, P. Incidence and clinical and immunological characteristics of primary *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, p. e892–896, 2013.
- MAHAMED, D. A.; MILLS, J. H.; EGAN, C. E.; DENKERS, E. Y.; BYNOE, M. S. CD73-generated adenosine facilitates *Toxoplasma gondii* differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 109, p. 16312–16317, 2012.
- MAHAMED, D. A.; TOUSSAINT, L. E.; BYNOE, M. S. CD73-generated adenosine is critical for immune regulation during *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun**, v.83, p. 721–729, 2015.
- MAJUMDER, P.; TRUJILLO, C.A.; LOPES, C.G.; RESENDE, R.R.; GOMES, K.N.; YUAHASI, K.K.; BRITTO, L.R.G.; ULRICH, H. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. **Purinergic Signal**, v.3, p.317–31, 2007.
- MARIATHASAN, S.; MONACK, D.M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews - Immunology**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2007.
- MAXI, J.; OBERHELMAN, S.; MERCANTE, D.E.; BAGBY G.J.; NELSON, S.; MOLINA, P. Brain Region Specific Association of Microtubule-Associated Protein 2 with Inflammatory and Growth Factor Gene Expression. **FASEB**, v. 31, n.869.2, 2017.
- MCCABE, R.E. **Antitoxoplasma chemotherapy**, in: D.M.H. Joynson, T.G. Wreghitt (Eds.), *Toxoplasmosis. A Comprehensive Clinical Guide*, Cambridge University Press, p. 319–359, 2001.
- MENDEZ, O.A.; KOSHY, A.A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. **PLoS Pathog**, v. 13, n.7, p. e1006351, 2017.
- MENZIES, R.I.; TAM, F.W.; UNWIN, R.J.; BAILEY, M.A. Purinergic signaling in kidney disease. **Kidney International**, v. 91, n. 2, p. 315–323, 2017.
- METZGER, J.J.; SIMUNOVIC, M.; BRIVANLOU, A.H. Synthetic embryology: controlling geometry to model early mammalian development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.52, p. 86-91, 2018.

- MIGITA, H.; KOMINAMI, K.; HIGASHIDA, M.; MARUYAMA, R.; TUCHIDA, N.; MCDONALD, F.; SHIMADA, F.; SAKURADA, K. Activation of adenosine A₁ receptor–induced neural stem cell proliferation via MEK/ERK and Akt signaling pathways. **J Neurosci Res**, v. 86, n.13, p. 2820-2828, 2008.
- MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; FULLER, S. J.; ZAKRZEWSKI, A. M.; LEES, M. P.; SAUNDERS, B. M.; SMITH, N. C. The Role of the P2X7 Receptor in Infectious Diseases. **PLoS Pathogens**, v.7, n.11, p. e1002212, 2011.
- MOREIRA-SOUZA, A. C. A.; ALMEIDA-DA-SILVA, C. L. C.; RANGEL, T. P.; ROCHA, G.; BELLIO, M.; ZAMBONI, D. S.; COUTINHO-SILVA, R. The P2X7 Receptor Mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. **Frontiers in Immunology**, v.8, 2017.
- NEARY, J.T.; ZIMMERMANN, H. Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 4, p. 189-198, 2009.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences**, v. 148, p. 369-372, 1909.
- OGATA, T.; CHUAI, M.; MORINO, T.; YAMAMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; SCHUBERT, P. Adenosine triphosphate inhibits cytokine release from lipopolysaccharide-activated microglia via P2Y receptors. **Brain Res**, v. 981, n.1–2, p.174–183, 2003.
- OKUDA, T.; YOKOTSUKA, K. Trans-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. **Am J Enol Vitic**, v.67, p. 93–9, 1996.
- OLIVEIRA, S.L.; PILLAT, M.M.; CHEFFER, A.; LAMEU, C.; SCHWINDT, T.T.; ULRICH, H. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. **Cytometry Part A: the Journal of International Society for Analytical Cytology** v.83, p.76-89, 2013.
- OTHMAN, T.; YAN, H.; RIVKEES, S.A. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. **Glia**, v.44, p. 166–172, 2003.
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n.12, 1385–1394, 2009.
- PASINETTI, G. M.; WANG, J.; HO, L.; ZHAO, W.; DUBNER, L. Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1202–1208, 2015.
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars Fetal Neonatal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 214-223, 2007.

- PETIT-JENTREAU, L.; TAILLEUX, L.; COOMBES, J.L. Purinergic Signaling: A Common Path in the Macrophage Response against Mycobacterium tuberculosis and Toxoplasma gondii. **Front Cell Infect Microbiol**, v.7, p.347, 2017.
- POCHE, F. Das System der Protozoa. **Archives in Protistenk**, v. 30, p. 125-321, 1913.
- POCOCK, J.M.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends In Neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 527-535, 2007.
- PORRO, C.; CIANCIULLI, A.; CALVELLO, R.; PANARO, M.A. Reviewing the role of resveratrol as a natural modulator of microglial activities. **Curr Pharm Des**, v. 21, p.5277–91, 2015.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev.** v.50, p. 413-492, 1998.
- RAMÓN Y CAJAL, S. **Degeneration e Regeneration of the nervous system**. London: Oxford University Press, 1928.
- REMYNTOON, J.S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. **Toxoplasmosis**. In: Remington J.S., Klein J.O., editors. Infectious diseases of the fetus and newborn. ed.5th. Philadelphia: W.B. Saunders.p. 205–346, 2001.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
- ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, p. 409-430, 2006.
- RODRIGUES, R.J.; TOMÉ, A.R.; CUNHA, R.A. ATP as a multi-target danger signal in the brain. **Front. Neurosci**, v. 9, p.148, 2015.
- ROMERO-PÉREZ, A.I; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; BUXADERAS, S.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. Resveratrol and piceid as varietal markers of white wines. **J Agric Food Chem**, v.44, p.1975–8, 1996.
- ROOS, D. S.; DONALD, R.G.; MORRISSETTE, N.S.; MOULTON, A.L.Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Methods in Cell Biology**, v. 45, p. 27-63. 1994.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **J Am Med Assoc**, v. 116, p. 801-807, 1941.
- SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v. 21, n.10, p. 476–481, 2005.

SALE, S.; VERSCHOYLE, R.D.; BOOCOOCK, D.; JONES, D.J.; WILSHER, N.; RUPARELIA, K.C.; POTTER, G.A.; FARMER, P.B.; STEWARD, W.P.; GESCHER, A.J. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. **British Journal of Cancer**, v. 90, n.3, p. 736–744, 2004.

SANDERS, T.H.; MCMICHAEL, R.W.JR.; HENDRIX, K.W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. **J Agric Food Chem**, v.48, p.1243–6, 2000.

SAWADA, K.; ECHIGO, N.; JUGE, N.; MIYAJI, T.; OTSUKA, M.; OMOTE, H.; YAMAMOTO, A.; MORIYAMA, Y. Identification of a vesicular nucleotide transporter. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, p.5683-5686, 2008.

SHWAB, E.K.; ZHU, X.Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v.141, n.4, p.453-461, 2014.

SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BONAN, C.D.; WYSE, A.T.. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, p. 77-98, 2007.

SCHMATZ, R.; PERREIRA, L.B.; STEFANELLO, N.; MAZZANTI, C.; SPANEVELLO, R.; GUTIERRES, J.; BAGATINI, M.; MARTINS, C.C.; ABDALLA, F.H.; DADI DA SILVA SERRES, J.; ZANINI, D.; VIEIRA JM, CARDOSO AM, SCHETINGER MR, MORSCH, V.M.Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of deltaaminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, v. 94, n.2, p. 374–383, 2012.

SCHOEN, S.W.; GRAEBER, M.B.; KREUTZBERG, G.W. 5'-Nucleotidase immunoreactivity of perineural microglia responding to rat facial nerve axotomy. **Glia**, v. 6, p. 314–317, 1992.

SCHWINDT, T.T.; TRUJILLO, C.A.; NEGRAES, P.D.; LAMEU C.; ULRICH H. Directed Differentiation of Neural Progenitors into Neurons Is Accompanied by Altered Expression of P2X Purinergic Receptors. **J Mol Neurosci**, v. 44, p. 141, 2011.

SEO, D.R.; KIM, K.Y.; LEE, Y.B. Interleukin-10 expression in lipopolysaccharide-activated microglia is mediated by extracellular ATP in an autocrine fashion. **Neuroreport**, v.15, n.7, p.1157–1161, 2004.

SERI, B.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; MCEWEN, B.S.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. **J Neurosci**, v. 21, p. 7153-60, 2001.

- SHETH, S.; BRITO, R.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L.; RAMKUMAR, V. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, 1 v.5, n.2, p. 2024–2052, 2014.
- SHUKLA, V.; ZIMMERMANN, H.; WANG, L.; KETTENMANN, H.; RAAB, S.; HAMMER, K.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; BRAUN, N. Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. **J Neurosci Res**, v. 80, p. 600–610, 2005.
- SIDMAN, R.L.; MIALE, I.L.; FEDER, N. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. **Exp Neurol**, v. 1, p. 322–33, 1959.
- SIN, T.K.; YUNG, B.Y.; YIP, S.P.; CHAN, L.W.; WONG, C.S.; TAM, E.W.; SIU, P.M. SIRT1-dependent myoprotective effects of resveratrol on muscle injury induced by compression. *Front Physiol*, v. 6, p. 293, 2015.
- SMITH, J.L.; SCHOENWOLF, G.C. Neurulation: coming to closure. **Trends Neurosci**, v. 20, p. 510-1, 1997.
- SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; KLEIN, C.H.; RIBEIRO, L.C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in south of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n. 2, p.173-177, 2005.
- SPERLÁGH, B.; VIZI, E.S.; WIRKNER, K.; ILLES, P. P2X7 receptors in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 78, n.6., p.327-346, 2006.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protooz parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il Kala - azar dell'umo. **Revista Social Ciência e Medicina**, v. 03, p. 109, 1908.
- STOCKWELL, J.; JAKOVA, E.; CAYABYAB, F.S. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. **Molecules**, v.22, n.4, p. 676, 2017.
- SUGDEN, K.; MOFFITT, T.E.; PINTO, L.; POULTON, R.; WILLIAMS, B.S.; CASPI, A. Is *Toxoplasma Gondii* Infection Related to Brain and Behavior Impairments in Humans? Evidence from a Population-Representative Birth Cohort. **PLOS One**, v. 11, n.2, p. e0148435, 2016.
- SUKTHANA, Y., Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n.3,p. 137 – 142, 2006.

SUZUKI, T.; HIDE, I.; IDO, K.; KOHSAKA, S.; INOUE, K.; NAKATA, Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. **J Neurosci**, v. 24, n.1, p.1–7, 2004.

SWENNEN, E.L.; BAST, A.; DAGNELIE, P.C. Immunoregulatory effects of adenosine 5'-triphosphate on cytokine release from stimulated whole blood. **Eur J Immunol**, v. 35, p. 852-858, 2005.

TAKAOKA, M. Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum*. **Nippon Kagaku Kaishi**, v.60, p. 1090–100, 1939.

TELLONE, E.; GALTIERI, A.; RUSSO, A.; GIARDINA, B.; FICARRA, S. Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–14, 2015.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

THOMPSON, J.; HAYES, N.; GEVARIA, A.; HARRIS, T. The role of microglia and monocyte-derived macrophages in *Toxoplasma gondii* infection of the brain. **The Journal of Immunology**, v.198, n.1, 2017.

TODD, K.D.; ROBITAILLE, R. Purinergic modulation of synaptic signalling at the neuromuscular junction. **Pflugers Arch**, v. 452, p. 608-614, 2006.

TONIN, A.; DA SILVA, A.S.; RUCHEL, J.B.; REZER, J.F.; CAMILLO, G.; FACCIO, L.; FRANÇA, R.T.; LEAL, D.B.; DUARTE, M.M.; VOGEL, F.F.; DE LA RUE, M.L.; LOPES, S.T. E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n.2, p. 325-330, 2013.

TONIN, A.; DA SILVA, A.S.; CASALI, E.A.; SILVEIRA, S.S.; MORITZ, C.E.; CAMILLO, G.; FLORES, M.M.; FIGHERA, R.; THOMÉ, G.R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.; RUE, M.DE L.; VOGEL, F.S.; LOPES, S.T. Influence of infection by *Toxoplasma gondii* on purine levels and E-ADA activity in the brain of mice experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 142, p. 51-58, 2014.

TORRES-PÉREZ, M.; TELLEZ-BALLESTEROS, R.I.; ORTIZ-LÓPEZ, L.; ICHWAN, M.; VEGA-RIVERA, N.M.; CASTROGARCÍA, M. GÓMEZ-SÁNCHEZ, A.; KEMPERMANN, G.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, G.B. Resveratrol Enhances Neuroplastic Changes, Including Hippocampal Neurogenesis, and Memory in Balb/C Mice at Six Months of Age. **PLoS One**, v. 10, n. 12: p. e0145687, 2015.

- TORREY E.F.; BARTKO J.J.; YOLKEN, R.H. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. **Schizophr Bull**, v.38, n.3, p. 642–7, 2012.
- TRUJILLO, C.A.; SCHWINDT, T.T.; MARTINS, A.H.; ALVES, J.M.; MELLO, L.E.; ULRICH, H. Novel perspectives of neural stem cell differentiation from neurotransmitters to therapeutics. **Cytometry Part A: the Journal of International Society for Analytical Cytology**, v. 75, p. 38-53, 2009.
- TSUDA, M.; SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KOIZUMI, S.; MIZOKOSHI, A.; KOHSAKA, S.; SALTER, M.W.; INOUE, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, v. 424, p.778-783, 2003.
- UESAKA, T.; NAGASHIMADA, M.; ENOMOTO, H. Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. **J Neurosci**, v.35, n.27, p. 9879-9888, 2015.
- UWE-KARSTEN, H. et al. (eds). **Glia**, v. 40, p. 131-269, 2002.
- VAZ, R.S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SUMIKAWA, E.; GUIMARÃES, A.T.B. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil. **Parasitol Res**, v. 106, p. 661, 2010.
- VAZ, R.S.; RAULI, P.; MELLO, R.G.; CARDOSO, M.A. Congenital toxoplasmosis: a neglected disease? – Current Brazilian public health policy. **Field Act Sci Rep**, v.3, p. 1-9, 2011.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131–149, 2003.
- WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M.H.; OATIS, J.E.JR.; WALLE, U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol metabolism in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v.32, n. 12, p. 1377–1382, 2004.
- WANG, D.G.; LIU, W.Y.; CHEN, G.T. A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. **J Pharmaceut Anal**, v. 3, p.241–7, 2013.
- WATTS, E.; ZHAO, Y.; DHARA, A.; ELLER, B.; PATWARDHAN, A.; SINAI, A.P. Novel approaches reveal that *Toxoplasma gondii* bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities *in vivo*. **mBio**, v. 6, n.5. p.e01155-15, 2015.
- WEBB, T.E.; SIMON, J.; KRISHEK, B.J.; BATESON, A.N.; SMART, T.G.; KING, B.F.; BURNSTOCK, G.; BARNARD, E.A. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. **FEBS Lett**, v. 324, p. 219-225, 1993.

- WEISKIRCHEN, S.; WEISKIRCHEN, R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy?, *Advances in Nutrition*, v. 7, n. 4, p. 706–718, 2016.
- WEISS, L. M.; KIM, K. *Toxoplasma gondii*. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. ed. Elsevier, Burlington (US), 2007, p.801.
- WEST, T.; ATZEVA, M.; HOLTZMAN, D.M. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev. Neurosci.*, v. 29, n. 363e372, 2007.
- WHO. Model Prescribing Information: Drugs Used in HIV-Related Infections, 1999. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.
- XIANG, Z. BURNSTOCK, G. Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia*, v. 52, n.11, p.119–126, 2005.
- XIE, J.; LIU, S.; WU, B.; LI, G.; RAO, S.; ZOU, L.LIANG, S. The protective effect of resveratrol in the transmission of neuropathic pain mediated by the P2X7 receptor in the dorsal root ganglia. *Neurochemistry International*, v. 103, p. 24–35, 2017.
- XU, H.; XIONG, C.; HE, L.; WU, B.; PENG, L.; CHENG, Y.LIANG, S. Trans-Resveratrol Attenuates High Fatty Acid-Induced P2X7 Receptor Expression and IL-6 Release in PC12 Cells: Possible Role of P38 MAPK Pathway. *Inflammation*, v, 38, n.1,p. 327–337, 2014.
- YAROVINSKY, F.; KANZLER, H.; HIENY, S.; COFFMAN, R.L.; SHER, A. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4⁺ T cell response. *Immunity*, v.25, n.4, p. 655–664, 2006.
- YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, p. 109–121, 2014.
- YU, XD.; YANG, J.; ZHANG, W.L.; LIU, D.X. Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma through induction of apoptosis and G2/M phase cell cycle arrest. *Tumor Biol*, v.37: n. 2871, 2016.
- ZHOU, X.M.; ZHOU, M.L.; ZHANG, X.S.; ZHUANG, Z.; LI, T.; SHI, J.X.; ZHANG, X. Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model. *J Surg Res*, v. 189, n. 159e165, 2014.
- ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*, v.49, p. 589-618, 1996.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases in the nervous system. In: *Novartis Foundation Symposium 276 Purinergic Signalling in Neuron-Glial Interactions* pp. 113–128, John Wiley & Sons, 2006.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Semin Cell Dev Biol.** v. 22, p. 194-204, 2011.

ANEXO I



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 IN VITRO EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii*", protocolada sob o CEUA nº 9509010915, sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva e equipe; Gustavo Thomé; Nathieli Bianchin Bottari; Maria Rosa Chitolina Schetinger** - 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 14/01/2016.

We certify that the proposal "Effects of resveratrol on neural differentiation in vitro in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*", utilizing 96 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 9509010915, under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva and team; Gustavo Thomé; Nathieli Bianchin Bottari; Maria Rosa Chitolina Schetinger** - 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/UFSM) in the meeting of 01/14/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **12/2015** a **01/2018**

Área: **Bloquímica Toxicológica**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **60 a 60 dias**

N: **96**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 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 *T. gondii*, parasito intracelular, desempenha um papel importante modulando a determinação do destino neural. Considerando que a toxoplasmose é uma doença parasitária com ampla distribuição mundial, grande potencial zoonótico e difícil tratamento, essas descobertas motivaram o objetivo deste estudo de investigar o efeito do resveratrol, um potente antioxidante natural encontrado em uvas, na proliferação/auto-renovação, migração e neurogênese de células progenitoras neurais em embriões e camundongos adultos infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*. Para isso, células progenitoras neurais (CPNs) serão obtidas do telencéfalo de embriões e da zona subventricular de camundongos fêmeas prenhas infectadas com cepa ME-49 de *T. gondii*. Dessa forma, as CPNs proliferam na presença de fatores de crescimento EGF e FGF2 tornando-se multipotentes e formando neuroesferas. A diferenciação, migração, proliferação e morte serão avaliadas pelos ensaios de incorporação de BrdU, EdU e marcação com iodeto de propídio em células infectadas com *T. gondii* e/ou tratadas com resveratrol. Análises de citometria de fluxo será realizada a fim de verificar a fase do ciclo celular e as vias de ação do resveratrol através das PI3/AKT e MAPK (ERK1/2 e p-38). A liberação de cálcio intracelular será determinada a fim de verificar a integração das rotas da MAPK ERK, sendo essas cascatas responsáveis por codificar repostas celulares. Juntos, os resultados obtidos deste estudo poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos de ação do resveratrol na regulação neural em camundongos infectados com *T. gondii*, colaborando para melhor entender o processo de patogenia da doença e prever aplicações terapêuticas de reparo neural em pacientes imunodeprimidos e embriões acometidos pela toxoplasmose.

Local do experimento: Os animais serão mantidos no Biotério Prédio 19.

Santa Maria, 21 de abril de 2017