



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

**RESVERATROL LIVRE E EM COMPLEXO DE INCLUSÃO
ASSOCIADO AO SULFAMETOXAZOL-TRIMETROPIM EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
COM *Toxoplasma gondii***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nathieli Bianchin Bottari

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**RESVERATROL LIVRE E EM COMPLEXO DE INCLUSÃO
ASSOCIADO AO SULFAMETOXAZOL-TRIMETROPIM EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
COM *Toxoplasma gondii***

Nathieli Bianchin Bottari

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

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

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

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

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

**RESVERATROL LIVRE E EM COMPLEXO DE INCLUSÃO
ASSOCIADO AO SULFAMETOXAZOL-TRIMETROPIM EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM
*Toxoplasma gondii***

elaborada por

Nathieli Bianchin Bottari

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof^a. Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal
(1º membro da banca - UFSM)

Prof. Dr. Silvia Gonzalez Monteiro
(2º membro da banca - UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2015.

Dedico esta dissertação 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
me dando apoio e amor incondicional.
Vocês são a razão para que eu continue em frente!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pai de todas as coisas, 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 aos meus pais Clandio e Rosane e a minha família, pelo amor, bons exemplos, incentivos e por compartilharem comigo momentos de alegria e tristeza. Não existem palavras para dar significado a tudo isso. Amo vocês.

Agradeço de modo especial ao meu orientador Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva, por toda a confiança, paciência e ensinamentos em mim depositados. Agradeço por repartir seus conhecimentos, colocando em minhas mãos as ferramentas com as quais me permitiu 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.

A 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 trabalhos e ser o exemplo de profissional sábio e humano.

A professora Vera Morsh, por permitir me sentir da família ENZITOX, pela liberdade e por ter aberto as portas para que eu trilhasse meu caminho.

Agradeço aos colegas e amigos, vocês fazem parte desse momento. Obrigada pelo carinho, pela força, pela ajuda incansável nos experimentos, pelo companheirismo e momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Agradeço em especial aos meus colaboradores, colegas Matheus Baldissera Dellaméa, Alexandre Tonin, Gustavo Thomé e Giovana Camillo, Prof^ª Virginia Cielo Rech, Prof^ª Fernanda Voguel, Prof^ª Sílvia Monteiro, Prof^ª Cristiane Luchese, Prof. Rafael Moresco, à Camila Tochetto e Rafael Fighera do Departamento de Patologia Veterinária, Prof^ª Daniela Leal por avaliar esta dissertação e a todos do Laboratório de Parasitologia Veterinária e Enzimologia Toxicológica pelas contribuições e disponibilidade de trabalharmos juntos, vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

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

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

Não ser do tamanho de nossa prisão, mas ser do tamanho de nossa vontade.

(Fabrício Carpinejar – Pequenos céus somados)

RESUMO

Dissertação de Mestrado

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

RESVERATROL LIVRE E EM COMPLEXO DE INCLUSÃO ASSOCIADO AO SULFAMETOXAZOL-TRIMETROPIM EM CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Toxoplasma gondii*

Autora: Nathieli Bianchin Bottari

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Rosa Chitolina Schetinger
Santa Maria, 23 de fevereiro de 2015.

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário de grande importância clínica capaz de ocasionar alterações bioquímicas e funcionais nas células do hospedeiro, principalmente no sistema nervoso central. Essas alterações, geralmente estão associadas à resposta inflamatória com danos teciduais e oxidação celular em hospedeiros imunocompetentes. A infecção por *T. gondii* estimula a produção de altos níveis de citocinas, tais como IL-12 e IFN- γ , pelas células do sistema imunológico, consistindo em um ponto principal no controle do parasito e resistência à doença. Como um potente antioxidante, o resveratrol tem se tornado um importante alvo de pesquisas graças a suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto, os mecanismos pelo qual o resveratrol exerce seu efeito são prejudicados pela baixa solubilidade e biodisponibilidade. Nesse sentido, uma forma de melhorar a biodisponibilidade do resveratrol é associá-lo a um complexo de inclusão. Desta maneira, os objetivos deste estudo foram investigar os benefícios do resveratrol associado a sulfamethoxazol-trimetropin (ST) no tratamento de camundongos infectados experimentalmente com *T. gondii*. Para o estudo, 60 camundongos foram divididos em dois grupos: não-infectados (n=24) e infectados com *T. gondii* (n=36). Os dois grupos foram subdivididos em subgrupos (n= 10) e tratados com resveratrol (livre e em complexo de inclusão 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina) isolado e associado com ST. Os grupos A-D foram compostos por animais saudáveis; grupos E-J consistiram de animais infectados por *T. gondii* (cepa VEG). O tratamento foi iniciado 20 dias após a infecção e manteve-se por 10 dias consecutivos nas doses orais de 0.5 mg kg⁻¹ de ST (grupos B e F), 100 mg kg⁻¹ de resveratrol livre (grupos C e G) e na forma de complexo de inclusão (grupos D e H), bem como na associação de ambas drogas (grupos I e J). Grupos A e E foram usados como controles, não tratados. Testes comportamentais (memória, ansiedade e locomoção) foram avaliados após o tratamento. Amostras de sangue, fragmentos de fígado e cérebro foram coletados a fim de avaliar os níveis de citocinas, alterações histopatológicas, contagem de cistos cerebrais, como também perfil oxidativo/antioxidante. Animais infectados com *T. gondii* apresentaram alterações comportamentais como ansiedade e perda de memória. A combinação com ST e resveratrol foi capaz de restaurar o tempo de latência no teste de esQUIVA INIBITÓRIA. Uma redução na contagem de cistos foi observada nos animais tratados com a associação de drogas assim como redução das lesões teciduais. Animais infectados apresentam aumento de citocinas pró-inflamatórias e redução da citocina anti-inflamatória (IL-10), assim como maior oxidação proteica em tecido hepático e cerebral. A combinação de ST com resveratrol livre e em complexo de inclusão aumentou os a capacidade antioxidante total (TAC) e os produtos de redução férrica (FRAP) em fígado e cérebro que pode ser interpretado pelo efeito protetor do resveratrol. Além disso, o resveratrol na forma de complexo de inclusão quando combinado à ST melhorou o efeito terapêutico da ST reduzindo os danos oxidativos, lesões hepáticas e número de cistos cerebrais no tratamento de camundongos infectados com *T. gondii*. Portanto, é possível sugerir que a combinação de ST com resveratrol em camundongos infectados parece exercer um efeito protetor nas células hospedeiras. O resveratrol na forma de complexo de inclusão foi a melhor opção terapêutica, pois controlou as respostas imunológicas séricas e teciduais, assim como o estresse oxidativo em camundongos infectados com *T. gondii*.

Palavras-chave: *T. gondii*, resveratrol, complexo de inclusão, oxidantes/antioxidantes, citocinas.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

FREE RESVERATROL AND IN INCLUSION COMPLEX ASSOCIATED TO SULFAMETHOXAZOLE-TRIMETROPIM IN MICE INFECTED EXPERIMENTALLY WITH *Toxoplasma gondii*

Author: Nathieli Bianchin Bottari
Advisor: Aleksandro Schafer Da Silva
Co-advisor: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Santa Maria, february 23, 2015.

The *Toxoplasma gondii* is a protozoan of great clinical importance can cause functional and biochemical changes in the host cells mainly in the central nervous system. These changes are usually associated with the inflammatory response to tissue damage and cell oxidation in immunocompetent hosts. *T. gondii* infection stimulate the production of high levels of cytokines such as IL-12 and IFN- γ by cells of the immune system, consisting of a main point in parasite control and disease resistance. As a potent antioxidant, resveratrol has become an important research subject due to its antioxidant and anti-inflammatory properties. However, the mechanism by which resveratrol exerts its effects are hampered by the low solubility and bioavailability. Accordingly, one way to improve the bioavailability of resveratrol is to associate with inclusion complexes. Thus, this study aimed to investigate the benefits of resveratrol associated with sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) in the treatment of experimentally infected mice with *T. gondii*. For the study, 60 mice were divided into two groups: non-infected (n = 24) and infected with *T. gondii* (n = 36). The two groups were divided into subgroups and treated with resveratrol (free and inclusion complex 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) isolated and associated with ST. The groups A to D composed by healthy mice and groups E to J consisting of animals infected by *T. gondii* (VEG strain). The treatment started 20 days post-infection for 10 consecutive days with oral doses of 0.5 mg kg⁻¹ of ST (groups B and F), 100 mg kg⁻¹ of free resveratrol (groups C and G) and inclusion complex of resveratrol (inclusion complex containing resveratrol) (groups D and H), as well as with an association of both drugs (groups I and J). Groups A and E were used as control, untreated. Behavioral tests (memory, anxiety and locomotion) were performed after treatment. Blood samples, liver and brain fragments were collected to evaluate the cytokine profile, pathological changes, brain cysts counts, as well as oxidant/antioxidant profile. Infected animals showed behavioral changes such as anxiety and memory loss. The combination ST and resveratrol was able to restore time latência in passive avoidance task. A reduction of the number of brain cyst was observed on animals treated with the combination of drugs. Infected animals show an increase in pro-inflammatory cytokines and reduction of anti-inflammatory cytokine (IL-10), as well as increased protein oxidation in liver and brain tissue. The combination of resveratrol and ST with free inclusion complex in increased the total antioxidant capacity (TAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) levels in liver and brain that can be interpreted by the protective effect of resveratrol. In addition, resveratrol in inclusion complex form when combined with ST improved therapeutic effect of ST reducing oxidative damage in liver and brain, reducing the number of cysts in the treatment of mice infected with *T. gondii*. Therefore, it is possible to suggest that the ST with resveratrol on treatment of infected mice can exerts a protective effect on host cells. The resveratrol in inclusion complex form was the best treatment option, for controlled tissue and serum immune responses, as well as oxidative stress in mice infected with *T. gondii*.

Keywords: *T. gondii*, resveratrol, inclusion complex, oxidant/antioxidant, cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Prevalência mundial de toxoplasmose em gestantes	17
Figura 2 - Morfologia de taquizoítos e bradizoítos de <i>T. gondii</i>	20
Figura 3 - Cistos teciduais de <i>T. gondii</i>	21
Figura 4 - Oocistos de <i>T. gondii</i>	22
Figura 5 - Representação do ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	23
Figura 6 - Principais receptores de reconhecimento para a proteína profilina liberada por <i>T. gondii</i>	26
Figura 7 - Mecanismos de defesa do hospedeiro frente à infecção por <i>T. gondii</i>	28
Figura 8 - Síntese do resveratrol e isômeros	32

MANUSCRITO 1

Figura 1 - Numbers of cysts in the brain of mice infected by <i>T. gondii</i> after treatment with resveratrol free, complex inclusion of resveratrol and in association with sulfamethoxazole-trimethoprim. Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), B (uninfected and treated with Sulfamethoxazole-Trimethoprim (ST)), C (uninfected and treated with Free Resveratrol (FR)), D (uninfected and treated with inclusion complex of resveratrol (ICR)), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and CIR). Note: Means and standart error followed by the same letters are not statistically different ($P>0.05$)	59
Figura 2 - Behavioral assessment of mice experimentally infected with <i>T. gondii</i> by elevated plus-maze. (2A) Shows % of entries in the open arms; (2B) % of time spent in the open arms. Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and ICR). (2A) effect of infection on the percentage of open arm entries and of time spent in open arms (2B). Infected mice presented an increase in the percentage of open arm entries and in time spent in open arms (B), when compared to the non-infected mice (control group). Note: Means \pm SE followed by equal letters in the same graph not statistically different ($P>0.05$)	60

Figura 3 - Behavioral assessment of mice experimentally infected with *T. gondii* showing reduced latency time when compared to the control group (non-infected animals). Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and ICR). (3A) Training (day 30 post-infection (PI)) and long-term memory (day 31 PI) (#B) of mice post-treatment with sulfamethoxazole-trimethoprim, free resveratrol and inclusion complex of resveratrol significantly restored the latency time that was previously decreased in mice infected. Note: Means±SE followed by the same letters are not statistically different (P>0.05)61

Figura 4 – Liver and brain histopathology of *T. gondii* infected mice. (A) Samples from group E showing random foci of necrosis (*) and high inflammatory infiltrate (+ + +). (B) Animals treated with sulfamethoxazole-trimethoprim (Group F) with moderate inflammatory infiltration (++) . (C) All animals treated with free resveratrol (Group G), inclusion complex resveratrol (Group H) and both (Groups I and J) showing mild inflammatory infiltration (+). (D) *T. gondii* cysts in mouse brain (arrow).62

MANUSCRITO 2

Figura 1 - Liver histology of mice infected by *Toxoplasma gondii*. Liver of mice treated with the combination of drugs (Group I - ST and resveratrol) showed less and smaller areas with foci of inflammatory infiltrates (A) compared to infected and untreated mice (B: group E) BAR: 100 µm79

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Modelo de tratamento para infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes e na infecção congênita30

MANUSCRITO 1

Table 1 - Description of the experimental design used in this study: number of animals and details of treatments56

Table 2 - Evaluation of the oxidant level in liver and brain of mice experimentally infected with *T. gondii* treated with resveratrol in its free and inclusion complex form and in association with sulfamethoxazole-trimethoprim57

Table 3 - Evaluation of antioxidant levels in liver and brain of mice infected experimentally with *T. gondii* under resveratrol chemotherapy on its free and inclusion complex form and in combination with sulfamethoxazole-trimethoprim58

MANUSCRITO 2

Table 1 - Pro and anti-inflammatory cytokines in the serum of animals experimentally infected with *T. gondii*, treated with sulfamethoxazole-trimethoprim and resveratrol in its free and nanoparticulated forms78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AOPP - Produtos de Oxidação Proteica Avançada

BHE - Barreira Hematoencefálica

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

CCR5 - C-C receptor 5-quimioquina

CDs- Células Dendríticas

CEIs - Células Intestinais

CYP - sistema do citocromo P450

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

ERO - Espécies Reativas ao Oxigênio

FRAP - Poder Antioxidante de Redução Férrica

HD - Hospedeiro Definitivo

HI - Hospedeiro Intermediário

HP β CD – Hidroxipropoil- β -ciclodextrina

ICAM-1 - Moléculas de Adesão Intracelular

IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase

IL-1 - Interleucina-1

IL-3 - Interleucina-3

IL-6 - Interleucina-6

IL-8 - Interleucina-8

IL-10 - Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

INF- γ - Interferon – gama

iNOS- Óxido Nítrico-Sintase induzida

ME49 – Cepa de *T. gondii*, tipo II

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

MYD88 - Proteína 88 de Diferenciação Mielóide a Resposta Imune Primária

NK - *natural killer*

NOS - Óxido Nítrico Sintase

ON - Óxido Nítrico

PCR-RFLP – Reação em Cadeia da Polimerase- Fragmentos de Restrição de Polimorfismos

PMNS - Polimorfonucleares

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

SIRT - Gene de codificação para histona deacetilase

SNC - Sistema Nervoso Central

ST - Sulfametoxazol-trimetropim

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

TAC - Capacidade Antioxidante Total

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- alfa

TOS - *Status* de Oxidação Total

TRL - Receptor de reconhecimento celular

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

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

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA UDESC	96
---	----

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ANEXOS

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MANUSCRITOS	36
3.1 Manuscrito 1	36
3.2 Manuscrito 2	64
4. DISCUSSÃO	80
5. CONCLUSÕES	84
6. REFERÊNCIAS	86
7. ANEXOS	96

APRESENTAÇÃO

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

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

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

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para o qual foram submetidos: *Parasitology International & Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*.

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909) 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). Este parasito possui ocorrência cosmopolita, assim como apresenta uma ampla capacidade de parasitar diversos tipos celulares e infectar praticamente qualquer espécie de animal de sangue quente, incluindo a espécie humana (DUBEY, 2012).

A infecção causada pelo protozoário *T. gondii*, constitui uma das zoonoses mais difundidas no mundo, cerca de um terço da população mundial é soropositivo para toxoplasmose (TENDER et al., 2000). Estima-se que 20 a 90% da população mundial já estiveram em contato com o *T. gondii* (SPALDING, 2005). As maiores taxas de incidências ocorrem em regiões de clima quente, áreas tropicais de baixas latitudes e clima seco (FERREIRA et al., 2004; Figura 1). No Brasil, a elevada prevalência em gestantes grávidas, está diretamente relacionada ao clima tropical quente propício para a sobrevivência dos oocistos de *T. gondii* e aos hábitos de consumo de carnes mal cozidas.

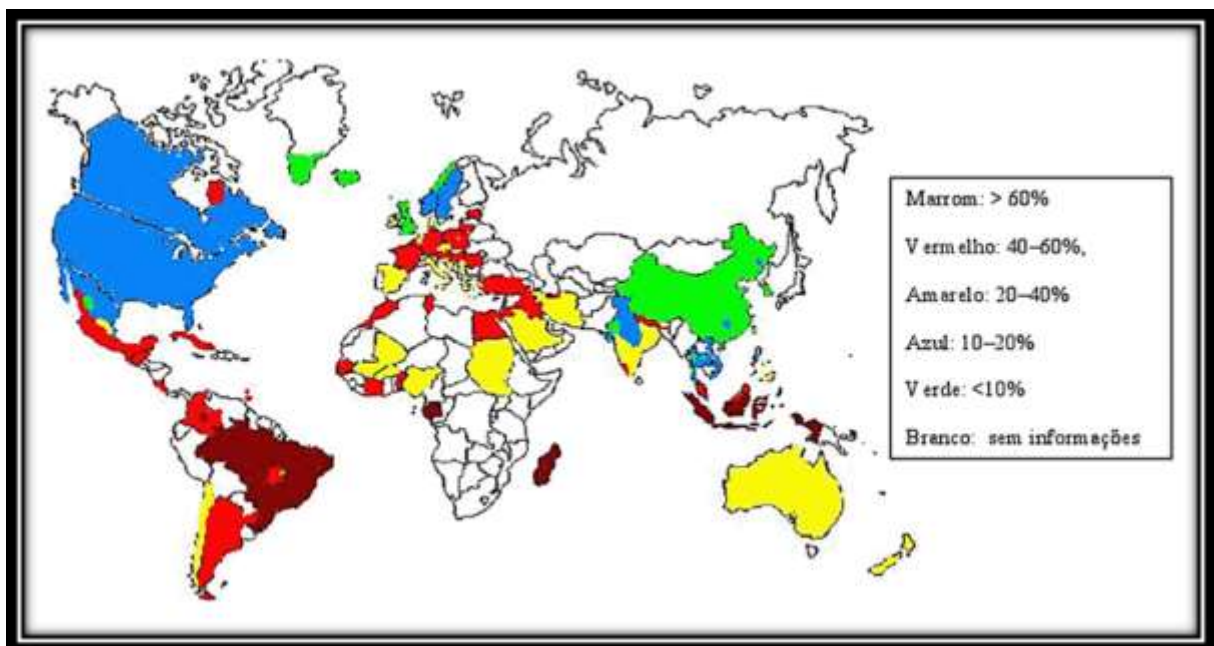


Figura 1- Prevalência mundial de toxoplasmose em gestantes (PAPPAS, 2009).

A transmissão vertical da toxoplasmose ocorre em 20 a 50% dos casos de primo infecção materna ou na forma latente (JONES et al., 2001; ELSHEIKA, 2008). As crianças infectadas com *T. gondii* podem apresentar microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardamento mental e psicomotor (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; ELSHEIKA, 2008). Embora a prevalência de infecção por *T. gondii* esteja relacionada à variação geográfica, uma vez infectados, os hospedeiros desenvolvem uma infecção aguda evoluindo para a fase crônica.

Em indivíduos saudáveis, a toxoplasmose geralmente é assintomática, porém linfadenopatia ou distúrbios oculares podem ocorrer em alguns pacientes (SU et al., 2010). Estudos demonstram que no Brasil, a região sul é uma área na qual a toxoplasmose ocular apresenta-se endêmica conforme Glasner (1992), pois no estudo envolvendo 1042 moradores da região, observou-se que 17,7% das lesões encontradas na retina dos sujeitos pesquisados eram compatíveis com a toxoplasmose ocular.

Por outro lado, em pacientes imunossuprimidos, a toxoplasmose se exhibe na forma aguda, podendo levar a neurotoxoplasmose (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). A grande preocupação ocorre na toxoplasmose congênita, uma vez que o *T. gondii* é capaz de ultrapassar a barreira transplacentária e ocasionar danos graves ao sistema nervoso central (SNC) do feto quando adquirida no primeiro trimestre de gestação (BARRAGAN e SIBLEY, 2003; DUBEY et al., 2008).

Nos Estados Unidos, na década de 90 estimava-se um custo anual acima de cinco milhões de dólares com tratamentos de crianças congenitamente infectadas (FRENKEL, 1998; GUERINA et al., 1994). A incidência mundial da toxoplasmose congênita já foi de 1 a 6 em cada 1000 nascimentos (FREYRE et al., 2006). Uma pesquisa realizada na cidade de Uberlândia-MG, com 805 mães atendidas em hospitais públicos e privados, demonstrou soroprevalência de 51%, enquanto a incidência de toxoplasmose congênita foi de 4,9 em cada 1000 nascidos (SILVA-SEGUNDO, 2002). Tendo em vista as altas taxas de prevalência da toxoplasmose, sua transmissão à espécie humana e a patogenicidade em animais, investigações relativas acerca dessa patologia devem ser estudadas.

Historicamente, o protozoário *T. gondii* foi reconhecido pela primeira vez no Brasil pelo Instituto Biológico de São Paulo (1908) ao observarem corpúsculos parasitários em coelhos. As lesões patológicas descritas por Splendore (1908) eram semelhantes as ocasionadas pelo parasito *Leishmania*. Extensas pesquisas envolvendo este novo protozoário permitiu relacionar as lesões observadas e a relação do parasito com as células intracelulares do hospedeiro. No mesmo ano, Nicolle e Manceux (1908) no Instituto Pasteur de Tunis

relataram o parasito em roedores (Gundi - *Ctenodactylus gundi*) e o nomearam de *Toxoplasma gondii*, baseados na morfologia (*toxon* = arco, *plasma* = vida) e no hospedeiro (*gundi*).

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). Frenkel (1973) foi o primeiro a descrever a morfologia dos taquizoítos (do Grego *tachos* = *veloz*). Os taquizoítos são capazes de invadir todos os tipos de células sendo considerados os estágios de multiplicação e de disseminação rápida (DUBEY, 1998). Possuem forma arqueada (Figura 2A), com aproximadamente 6 µm de comprimento e 2 µm de largura (Figura 2A), encontrados durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2003).

Morfologicamente, o taquizoíto possui duas regiões distintas: (I) o núcleo com membrana dupla, uma externa e contínua e a outra interna; (II) a extremidade anterior afilada, formada por um conjunto de organelas responsáveis pela formação de um vacúolo parasitóforo (HOWE e SIBLEY, 1995; BARRAGAN e SIBLEY, 2003).

Na fase aguda, a qual geralmente ocorre dentro de 8 a 12 dias pós-infecção, os taquizoítos são capazes de atravessar barreiras teciduais como a hematoencefálica e transplacentária, podendo atingir o feto (WEISS e KIM, 2007). Após a invasão às células do hospedeiro, 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. Esta multiplicação favorece a infecção em diversos locais do organismo, como o SNC, olhos, musculatura esquelética, cardíaca e a placenta (HOWE e SIBLEY, 1995; BARRAGAN e SIBLEY, 2003).

A forma de resistência do *T. gondii* nos tecidos é o cisto contendo bradizoítos (do Grego *brady* = lento), sendo os principais sítios de infecção o miocárdio, cérebro e musculatura esquelética (FRENKEL 1973; REMINGTON e CAVANAUGER 1965). Os bradizoítos incidem na fase crônica da infecção e diferem morfologicamente pouco dos taquizoítos (Figura 2B). 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).

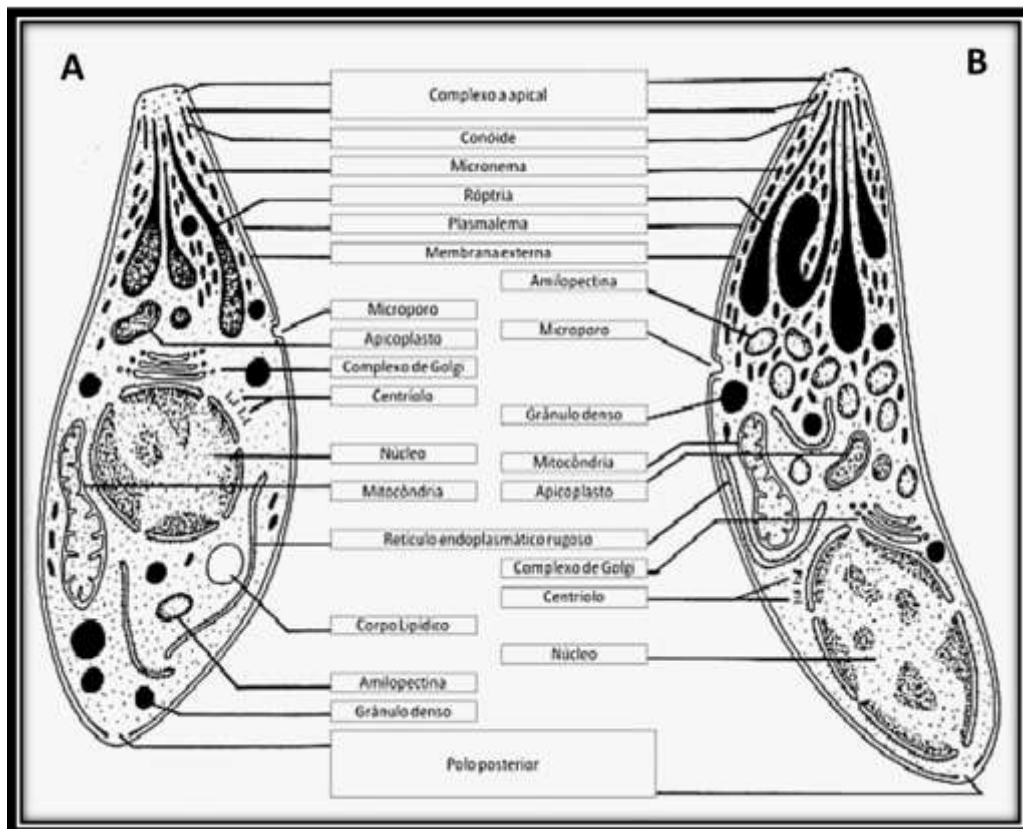


Figura 2- Morfologia de taquizoíto (A) e bradizoíto (B) de *T. gondii*. Adaptado de DUBEY, (1998).

Um aspecto importante do cisto é uma possível reativação da infecção, causada pela liberação de bradizoítos, que se transformam em taquizoítos e promovem uma nova infecção (WEISS e KIM, 2007). A reativação da infecção latente por *T. gondii* pode ocorrer em vários tecidos, mas o mais importante clinicamente é o SNC, pelo risco do desenvolvimento de encefalite (REMINGTON, 2001; CARRUTHERS, 2002). Na infecção latente, os cistos teciduais crescem conforme os bradizoítos vão se dividindo por endodiogenia (FERGUSON e HUTCHISON, 1987a; 1987b), variando de acordo com seus tamanhos sendo que cistos jovens tendem a ser menores (cerca de 5 μm), contendo um a dois bradizoítos, ao passo que cistos mais velhos podem conter centenas de bradizoítos (DUBEY, 1998). No tecido cerebral, os cistos teciduais são geralmente esferoidais e raramente atingem 70 μm de diâmetros (Figura 3A), enquanto os cistos intramusculares são alongados e podem atingir até 100 μm (Figura 3B) (DUBEY, 1977; DUBEY, 1993).

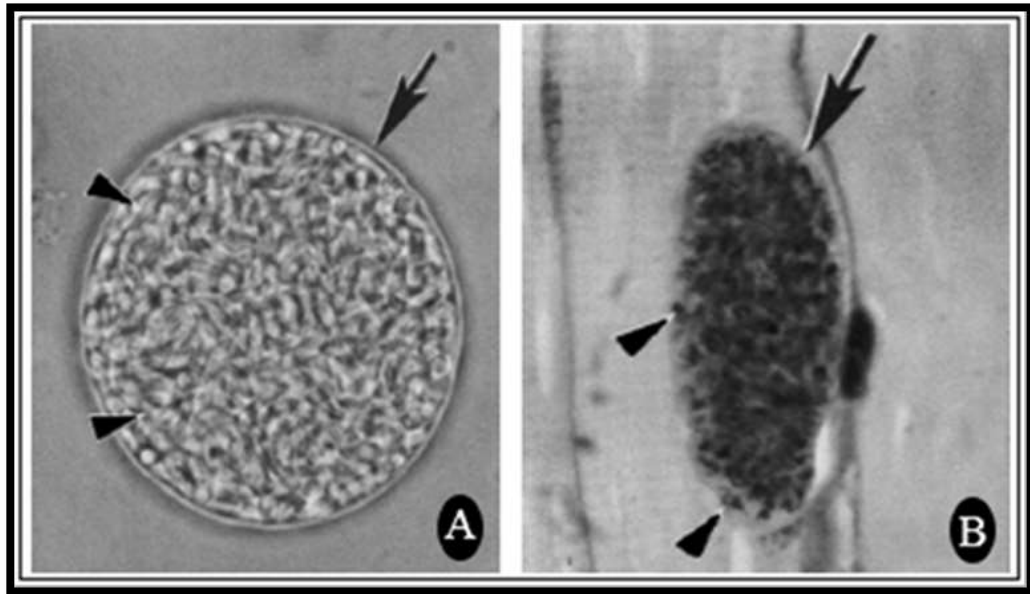


Figura 3- Cistos teciduais de *T. gondii*. (A) cisto cerebral; (B) cisto muscular. Adaptado de HILL e DUBEY (2002).

Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais, incluindo pulmões, fígado e rins, eles são mais prevalentes nos tecidos neuronais e musculares, incluindo cérebro, olhos, músculos esqueléticos e cardíacos (DUBEY, 1993). A forma de estágio de cistos teciduais de *T. gondii* é o principal responsável pela transmissão da toxoplasmose de animais para humanos através da ingestão de carne crua ou mal cozida (AMATO NETO et al., 1995).

A última forma de estágio de *T. gondii* são os oocistos. Oocistos não esporulados (Figura 4A) possuem aspectos subsféricos a esféricos e medindo de 10 a 12 μm de diâmetro. Enquanto, os oocistos esporulados (Figura 4B) apresentam aspectos subsféricos a elípticos e medem 11 a 13 μm de diâmetro. Cada oocisto contem dois esporocistos elípticos, medindo de 6 a 8 μm . 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%. Os oocistos infectantes do parasito podem estar presentes nos alimentos e na água, e conforme Dubey (1998) podem sobreviver a uma temperatura de -20°C por até 28 dias, e até 360 dias a uma temperatura de 37°C .

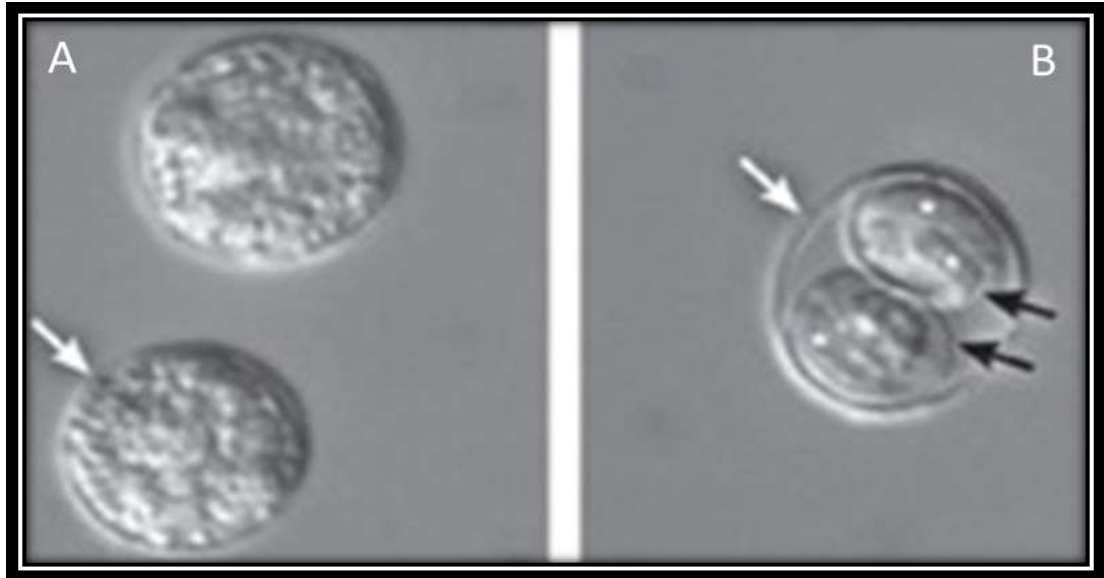


Figura 4 - Oocistos de *T. gondii*. (A) Oocisto não esporulado; (B) oocisto esporulado contendo dois esporocistos (flechas). Adaptado de DUBEY, (2010).

O ciclo biológico do *T. gondii* é do tipo heteroxeno, ocorrendo em duas fases distintas conforme demonstrado na Figura 5. A fase sexuada é enteroepitelial e ocorre apenas no hospedeiro definitivo (HD), sendo o HD membros da família *Felidae* (FRENKEL et al., 1975). 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 (BLACK e BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2002).

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. Este evolui dentro do epitélio formando uma parede externa dupla, dando origem ao oocisto (WEISS e KIM, 2007). Os oocistos não esporulados (Figura 5) são eliminados junto as fezes, portanto a esporulação ocorre no ambiente, em média de um a cinco dias após a excreção, estando 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) (Figura 5). Além disso, as formas acidentais de contaminação por auto-inoculação, transplante de órgãos e transmissão congênita podem ocorrer (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

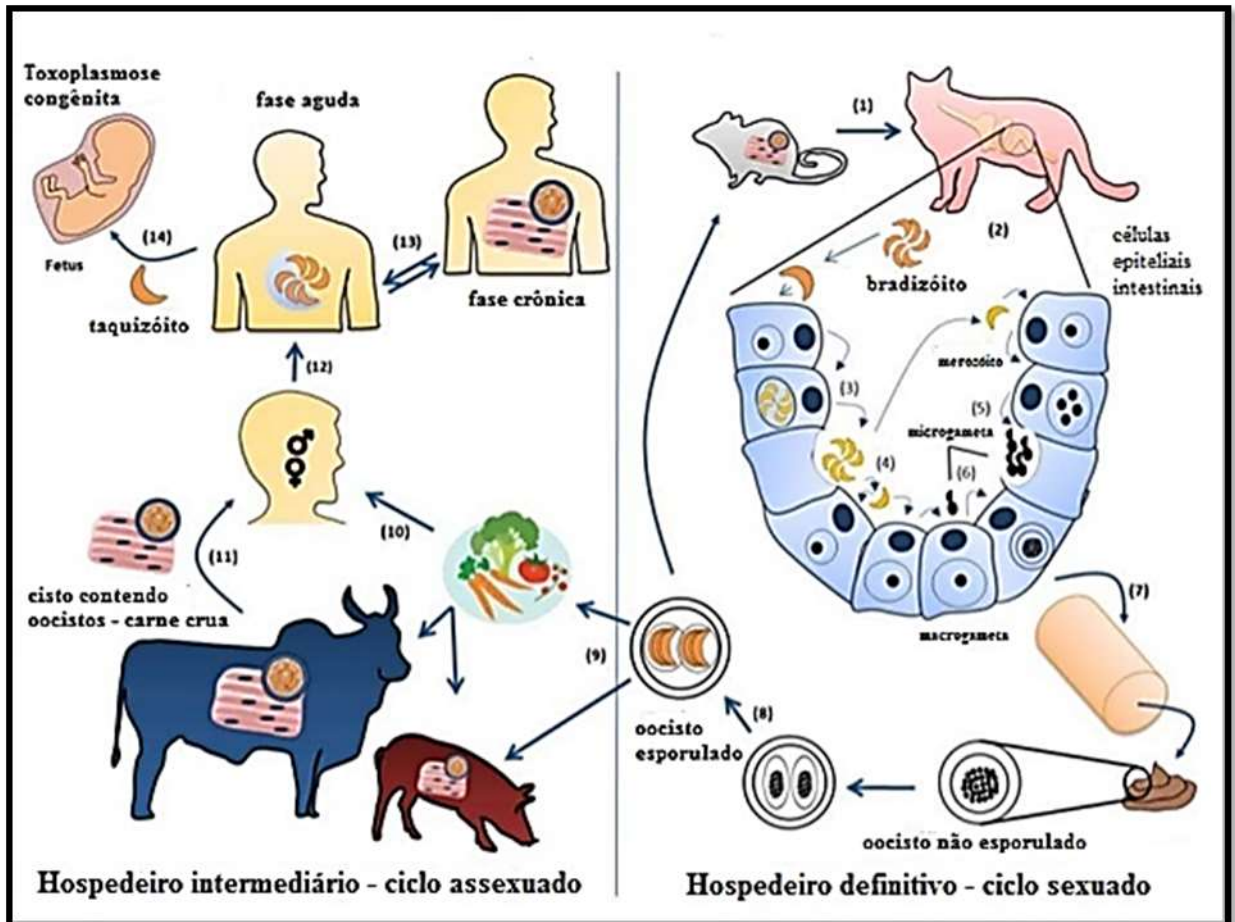


Figura 5- Representação do ciclo biológico de *T. gondii*. O ciclo biológico ocorre em duas fases, a sexuada no HD e assexuada no HI. Oocistos não esporulados são eliminados através das fezes de felídeos, sofrem esporulação no ambiente e podem contaminar água e alimentos. Uma vez ingerido cistos contendo bradizoítos, homem e animal adquirem a toxoplasmose. Adaptado de <http://pixshark.com/toxoplasma-gondii-morphology.htm>. Acesso em 03 de janeiro de 2015(modificado).

Apesar da presença de um ciclo sexuado, o *T. gondii* possui um genótipo numericamente pequeno e estável (KHAN et al., 2011). Essa estabilidade pode ser explicada por dois aspectos principais: (I) o fato do *T. gondii* ser haploide, permitindo que um felino infectado por uma única cepa excrete oocistos que darão origem a microrganismos geneticamente idênticos à cepa original (II) a possibilidade de transmissão através do carnivorismo acaba por dispensar o ciclo sexuado (BOOTHROYD e GRIGG, 2002).

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 (HOWE e SIBLEY, 1995; DARDÉ et al., 2003; 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 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 a casos humanos de toxoplasmose aguda. O genótipo tipo II, 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 que são caracterizadas por uma menor patogenicidade e pela formação de cistos (ROOS et al., 1994). Tendo em vista que não existem quimioterápicos disponíveis para eliminação de cistos teciduais, os processos que levam a cronificação e aspectos patofisiológicos envolvidos por essa linhagem, merecem ser estudados. Em contato com o sistema imune, a cepa VEG induz a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos, os quais geralmente se encontram na forma latente interior de cistos teciduais. Com a presença do parasito no SNC, alterações comportamentais podem ocorrer (SILVA et al., 2010; GATKOWSKA et al., 2012).

Estudos experimentais em diferentes espécies de roedores revelaram que os mecanismos de transmissão e intensidade das lesões resultantes da toxoplasmose estão associados a alterações comportamentais do hospedeiro frente ao parasito (CORRÊA et al., 2014). Cox e Holland (2001) relataram que camundongos infectados com *T. gondii* apresentam uma maior ansiedade, o que aumenta o fator de inibição destes animais deixando-os mais susceptíveis a predação e à transmissão da zoonose aos felídeos.

Recentemente, estudos demonstraram uma relação direta em pacientes infectados por *T. gondii* à alteração obsessiva compulsiva (SOLEIMANI et al., 2011), depressão (GROER et al., 2011), comportamento suicida (PETERSEN et al., 2012) e até mesmo esquizofrenia (TORREY et al., 2012). A passagem de taquizoitos pela barreira hematoencefálica (BHE) envolve a interação do antígeno parasitário MIC2 com moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) da célula hospedeira, processo referido como transmigração paracelular (HARKER et al., 2014; HSU et al., 2014).

Após esse processo, os taquizoitos se dirigem da corrente sanguínea para regiões específicas cerebrais. 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, córtex somatossensorial), hipocampo e amígdala, áreas que estão diretamente envolvidas no controle de comportamento de defesa e processamento de emoções (BERENREITEROVÁ et al., 2011). Nosso grupo de pesquisas, já demonstrou que as mudanças comportamentais em animais infectados podem estar relacionadas ao processo inflamatório e a alterações nas concentrações de neurotransmissores cerebrais, tais como acetilcolina, óxido nítrico (ON) e adenosina (TONIN et al., 2014a; TONIN et al. 2014b).

Associado ao processo de resistência do parasito, que ocasionalmente ao se romper, liberam os bradizoítos que evoluem e reinfectam células vizinhas, sabe-se que a resposta imunológica limita a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradicam os cistos já existentes encontrados no SNC (KAWAZOE, 2002; WEISS e KIM, 2007).

Tipicamente, a infecção por *T. gondii*, resulta na indução de uma resposta imunológica celular e humoral com produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias responsáveis pelo controle da infecção (KAMIYAMA e HAGIWARA, 1982; BOHNE et al., 1993). Além disso, o *T. gondii* pode ser indiretamente detectado através do reconhecimento de danos teciduais que estão associados com a exacerbada produção de interferon gama (INF- γ).

Assim que o *T. gondii* entra em contato com as células enteroepiteliais do hospedeiro, células dendríticas (CD) são produzidas em resposta ao reconhecimento de uma proteína de superfície parasitária – profilina, que é liberada pelo parasito e é responsável por regular a motilidade e invasão do parasito na célula hospedeira (PLATNER et al., 2008).

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 6). Um estudo, utilizando ratos *knockout*

MYD88 (proteína 88 de diferenciação mielóide a resposta imune primária) em TLR demonstraram ter uma produção defeituosa da interleucina-12 (IL-12) e menor liberação de IFN- γ após a infecção por *T. gondii* (SCANGA et al., 2002), sendo que esta observação levou a ideia de que a ativação de MYD88 por TRL em CDs conduz a ativação de IL-12.

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 et al., 2006). A MYD88 na presença de IRF8 induz a transcrição da IL-12 nas CDs (Figura 6 e 7A).

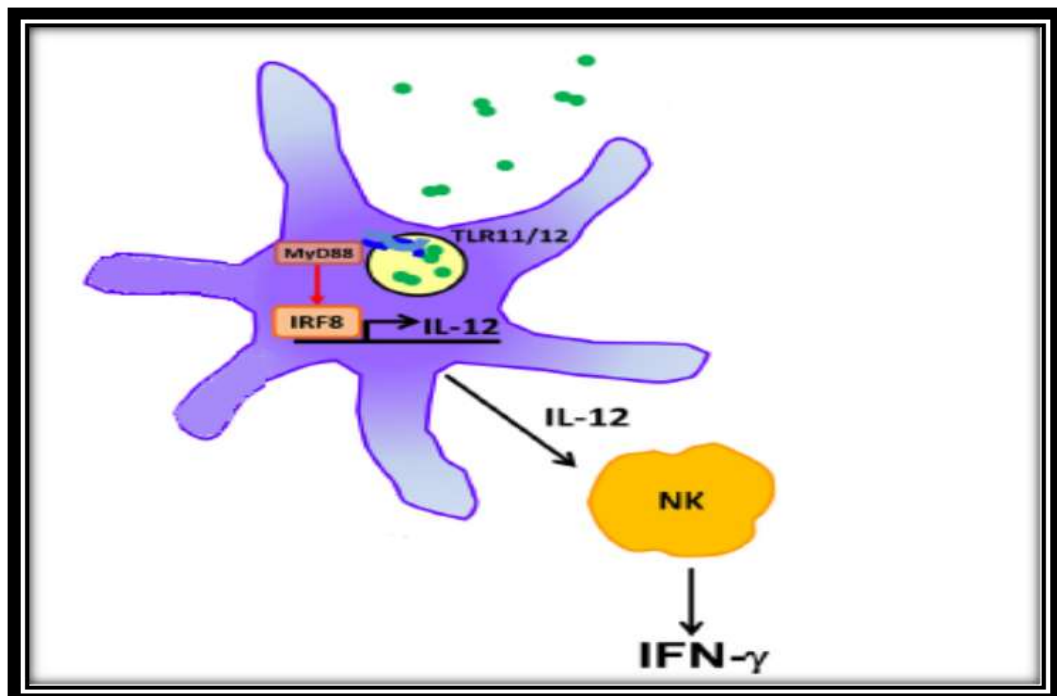


Figura 6- Toll-like Receptors (TLR11) (TLR12) são os principais receptores de reconhecimento para a proteína profilina liberada por *T. gondii*. TRL11 e TRL12 ativam uma via de sinalização de MYD88 dependente de IRF8 para expressar a produção de IL-12 em células dendríticas (CDs). Adaptado de YAROVINSKY et al. (2014).

Os macrófagos e CDs também são capazes de produzir IL-12, porém sua capacidade de resposta ocorre após a estimulação pelo IFN- γ . Como células apresentadoras de antígenos, os macrófagos produzem IL-12 em resposta a antígenos liberados por taquizoítos (Figura 7B). A IL-12 estimula as células *natural Killer* (NK), responsáveis por induzir a lise celular e a

secretar INF- γ , o qual induz a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ (Figura 7C).

A resposta imune pró-inflamatória, caracterizada por um perfil Th1, é efetiva no controle de taquizoítos, entretanto, ela pode ser danosa ao hospedeiro, devido principalmente à alta produção de INF- γ que acaba por lesar os tecidos infectados. Desse modo, é necessária a ação de mecanismos imunomoduladores para o estabelecimento de um balanço entre um perfil de resposta Th1 e Th2. Esse balanço é mediado pela interleucina-10 (IL-10), a qual é produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária. A IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a produção de IFN- γ por células NK, linfócitos T, sobre macrófagos ativados, sobre a diferenciação de clones Th1 de células T e sobre a produção de IL-12 por macrófagos e CDs (GAZZINELLI et al., 1996). A IL-12 estimula também a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺, os quais apresentam atividade citotóxica, induzindo a lise de células infectadas com consequente liberação de taquizoítos (Figura 7D) (ALIBERTI, 2005; MENZIES et al., 2008; MILLER et al., 2009).

Como células efectoras, os macrófagos inibem a replicação do *T. gondii* pela produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO), como o óxido nítrico, uma molécula antimicrobiana secretada pelo epitélio intestinal do hospedeiro que bloqueia o metabolismo do parasito, impedindo assim sua sobrevivência. Os macrófagos ativados por taquizoítos de *T. gondii* secretam ainda altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α), que possui atividades microcidas (HEGAB e AL-MUTAWA, 2003; MENZIES et al., 2008; MILLER et al., 2009). Ativados pelo IFN- γ , os macrófagos desempenham dois papéis importantes na célula do hospedeiro: (I) privação do triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasito, através da inibição da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Figura 7E); (II) estimulação da isoforma II (ou óxido nítrico-sintase induzida [iNOS]) da enzima Óxido Nítrico-Sintase (NOS) (Figura 7E) (PEFEFFERKON, 1984).

A indução da iNOS leva a uma produção de espécies reativas de nitrogênio, tóxicas aos bradizoítos de *T. gondii* que acabam por atacar o vacúolo parasitóforo. Neste ponto, um mecanismo compensatório, ou de *feedback* positivo se forma, pois estes macrófagos ativados pelo INF- γ , sintetizam o TNF- α , que por sua vez, aumentam a produção de iNOS (LIESENFELD et al., 1999). Porém, esses mecanismos de ativação e auto-regulação podem levar a uma superprodução de ON, INF- γ e TNF- α , contribuindo para uma situação de inflamação exacerbada no tecido epitelial intestinal, que quando foge do controle, pode contribuir com a morte do hospedeiro (LIESENFELD et al., 1999).

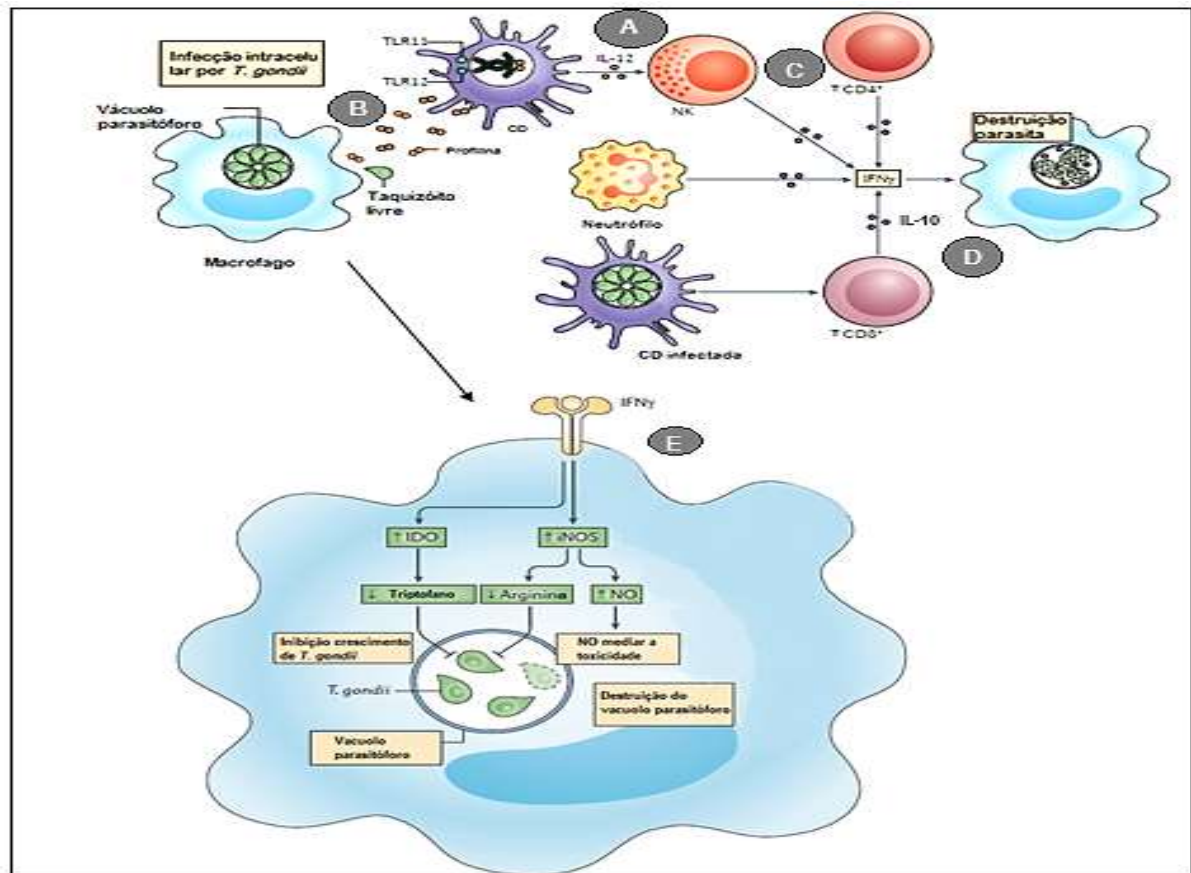


Figura 7- Mecanismos de defesa do hospedeiro frente a infecção por *T. gondii*. Adaptado de YAROVINSKY, (2014). Assim que o *T. gondii* entra em contato com as células epiteliais do hospedeiro uma proteína (profilina) é liberada pelo parasito. A profilina é reconhecida pelos receptores TLR 11 e/ou TRL 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 taquizóitos o INF- γ ativa os macrófagos (B). Macrófagos ativados, podem responder estimulando as enzimas IDO ou iNOS (E) a privação do triptofano essencial ao desenvolvimento do parasito ou a produção de ON levando a destruição do vacúolo parasitóforo.

De modo geral, os mecanismos de defesa imunológica exercidos pelas células imunes contra o *T. gondii* acaba por levar ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante, desencadeando um papel importante na apoptose do parasito conforme já relatado por Elsheika et al. (2009).

Existe ainda outro mecanismo de *feedback* positivo pelo qual as células intestinais (CEIs) do hospedeiro secreta citocinas inflamatórias como IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10 e o TNF- α que atuam contra o *T. gondii*. Essas por sua vez, recrutam mais células

polimorfonucleares (PMNs), tais como macrófagos, para os locais de infecção (KELLY et al., 2005). Uma vez recrutados, os PMNs podem participar na atração e migração de outras células imunes, tais como as CDs, as quais geralmente participam servindo como um *link* à resposta imune inata e adaptativa contra o *T. gondii* (WEISS e KIM, 2007).

As CDs (ALIBERTI et al., 2003), produzem também IL-12 em resposta à infecção por *T. gondii*, desempenhando um importante papel na imunidade celular em resposta a patógenos intracelulares, e na resposta imune celular. A interação de antígenos do parasito via receptor de quimiocinas CCR5 (C-C *chemokine receptor-5*) induz a síntese de IL-12, que, por conseguinte, acaba estimulando a síntese de INF- γ pelas células NKs e linfócitos T durante a infecção pelo *T. gondii* (SHER et al., 2003).

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 (ácido desoxirribonucleico) 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 (WHO, 1999). A tabela a seguir (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 Sulfadiazina	50 mg/kg de peso corporal duas vezes ao dia durante 2 dias 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 (REMYINGTON et al., 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 mielosupressão, devido a isso, as gestantes são orientadas a consumir o 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) aumentando os efeitos colaterais ocasionados por esses quimioterápicos.

Entretanto, estudos revelaram 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 (NOBREGA, 1991). 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 já bem elucidadas.

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol presente nas uvas, frutas vermelhas e amendoim. O resveratrol foi isolado pela primeira vez em 1940 de um heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) (TAKAOKA, 1940). Inicialmente caracterizado como uma fitoalexina (LANGCAKE e PRYCE, 1976), o resveratrol atraiu pouco interesse até 1992, quando foi postulado para explicar alguns dos efeitos cardioprotetores do vinho vermelho sobre população francesa. Mais tarde, o composto foi novamente isolado da raiz de *Polygonum cuspidatum*, uma planta usada na medicina tradicional chinesa e japonesa (VASTANO et al., 2000).

Desde então, dezenas de estudos revelam que o resveratrol é capaz de prevenir ou retardar a progressão de uma grande variedade de doenças, incluindo câncer (JANG et al., 1997; SLOWING et al., 1997; GESCHER et al., 2013), doenças cardiovasculares (BRADAMANTE et al., 2004) lesões isquêmicas (WANG et al., 2002; SINHA et al., 2002) bem como aumentar a resistência ao estresse e estender os tempos de vida de organismos como as leveduras (VALENZANO et al., 2006).

O resveratrol é uma fitoalexina da classe dos estilbenos com uma estrutura química constituída por dois anéis (KING et al., 2005). 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 (KIM et al., 2006). Esta estrutura é sintetizada naturalmente sob duas formas isômeras: *trans* e *cis*-resveratrol. O isômero *trans* é encontrado em maiores quantidades, e é responsável pelos efeitos biológicos do resveratrol.

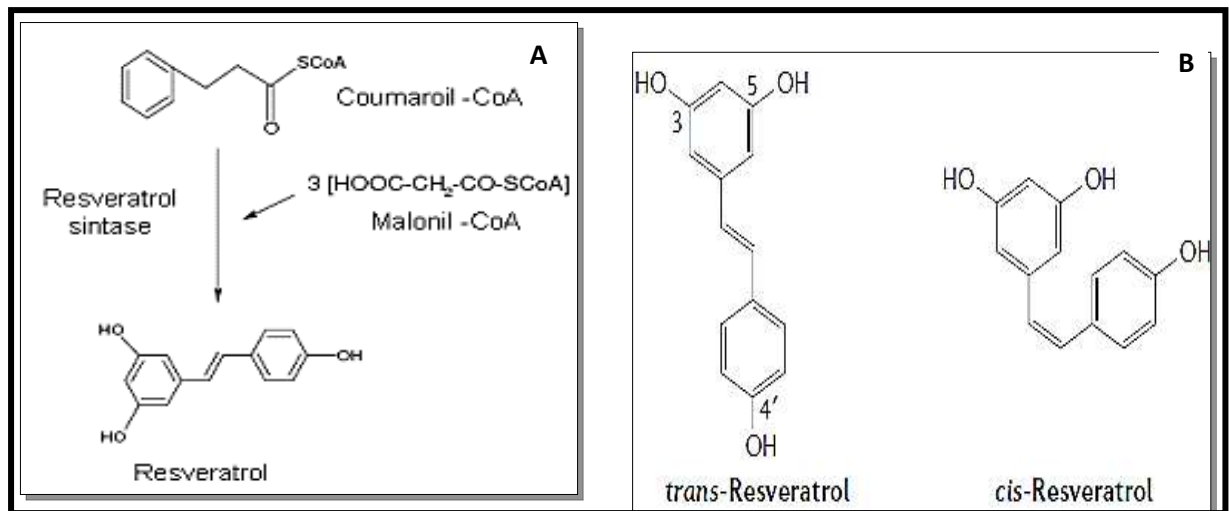


Figura 8 - Síntese do resveratrol (A), isômeros *trans* e *cis*-resveratrol (B). Adaptado de BAUR e SINCLAIR (2006).

O resveratrol possui uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas estabelecidas que contribui para seus efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversas patologias (FRÉMON et al., 2000; KING et al., 2006; SAIKO et al., 2008). Uma das mais conhecidas e importantes propriedades do resveratrol é sua alta capacidade antioxidante, atenuando os efeitos das EROs no organismo (FRABRIS et al., 2008). Tal propriedade está associada à estrutura química deste composto (KING et al., 2005), pois os grupos hidroxilas dos anéis fenólicos do resveratrol 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, oxidação proteica e danos ao DNA celular (MOKINI et al., 2007).

Estudos demonstram que o resveratrol é capaz de aumentar a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (SCHMATZ et al., 2012). O resveratrol também aumenta a atividade da SIRT (um membro da família da nicotinamida adenina dinucleótido desacetilases-dependente), resultando em maior resistência ao estresse celular (HOWITZ et al., 2003).

Além das propriedades antioxidantes, o resveratrol é um importante neuroprotetor em condições de injúria cerebral e nos processos neurodegenerativos (ANEKONDA, 2006). De fato, o resveratrol tem mostrado seu efeito neuroprotetor com redução de lesões neuronais (GAO et al., 2006). Em nível de SNC, o resveratrol mostrou-se eficiente na prevenção de déficits de memória em modelos experimentais de Alzheimer (SAIKO et al., 2008), uma vez

que devido a sua elevada solubilidade lipídica é capaz de atravessar a BHE e incorporar-se no tecido cerebral (WANG et al., 2002; JANNIN et al., 2004) contribuindo para seu efeito neuroprotetor.

Aliado a atividade antioxidante, o resveratrol possui efeitos anti-inflamatórios inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade humana e reduzindo a atividade da iNOS (KING et al., 2005; BAUR e SINCLAIR, 2006). Huang et al. (2011) demonstraram que o resveratrol protegeu a neurotoxicidade induzida por peptídeo A β , e o mecanismo parece estar envolvido pela supressão da iNOS. O resveratrol acaba estimulando a expressão de NO tecidual por um mecanismo de fosforilação levando ao efeito protetor com relaxamento endotelial (KLINGE et al., 2008).

Apesar dos inúmeros efeitos do resveratrol, seu rápido metabolismo e baixa absorção impedem que o composto exerça com integridade seu potencial. A absorção do resveratrol em ratos foi descrita pela primeira vez em 1996 (BERTELLI et al., 1996). Mas pouco se sabia sobre o destino metabólico do resveratrol. No entanto, no início dos anos 2000 um impulso de estudos relacionados a absorção do resveratrol em roedores levou a uma melhor compreensão do verdadeiro metabolismo do resveratrol (ANDLAUER et al., 2000).

Os resultados de estudos farmacocinéticos indicam que a biodisponibilidade oral do resveratrol é quase nula, o que põe em dúvida a relevância fisiológica e as altas concentrações normalmente utilizadas para experimentos *in vitro* (WENZEL e SOMOZA, 2005). Estes resultados sugerem que, enquanto a absorção de resveratrol não é afetada pela dose administrada, a conversão metabólica do composto é saturável à medida que a dose é aumentada. Sendo assim, uma percentagem mais elevada é excretada inalterada na urina, de modo que baixas concentrações de resveratrol são indicadas como tratamento. Segundo Walle et al. (2004), cerca de 70% do resveratrol administrado é absorvido, porém a maior parte dele é convertido nos seus conjugados, sulfato e glicuronídeo-resveratrol, revelando assim, baixa biodisponibilidade tecidual. Além disso, o resveratrol 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 resveratrol é metabolizado no fígado. As investigações sobre o metabolismo do resveratrol *in vivo* em modelos de roedores mostraram ser o fígado o principal local de acumulação para o resveratrol e seus metabolitos (SALE et al., 2004). Em indivíduos saudáveis, a excreção renal do resveratrol variou 26-34% nas doses compreendidas entre 1 e 0,5 mg kg⁻¹ (WALLE et al., 2004).

Em ensaios experimentais, o resveratrol tem sido utilizado na sua forma livre, quer como um sólido, em cápsulas ou dissolvido em diferentes veículos, sendo os mais comuns etanol e água por apresentarem efeito já bem reconhecido (AMRI et al., 2012). Enquanto as formas sólidas apresentam baixa hidrosolubilidade, o uso de excipientes acaba sendo a opção de escolha, porém mais fica mais susceptível a ação fotoluminosa. Nos últimos anos, diversos estudos concentraram-se em novas abordagens de formulação para estabilizar e proteger o resveratrol contra a degradação, aumentar a sua solubilidade em água, a fim de melhorar a sua biodisponibilidade e atingir locais específicos, como o SNC.

Nesse sentido, inúmeros transportadores coloidais com auxílio da nanotecnologia já foram utilizados, dentre eles os complexos de inclusão. Nam et al. (2005) utilizaram microesferas poliméricas, denominadas de nanocapsulas, como material de apoio para a estabilização e preservação de resveratrol. A atividade antioxidante do resveratrol foi preservada em mais de 93% em relação à formulação livre de resveratrol. Da mesma forma, Shi et al. (2008) utilizaram o resveratrol de forma encapsulada em cultura de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A formulação mostrou uma menor fotodecomposição, assim como eliminação de radicais livres.

A complexação do resveratrol com hidroxipropil- β -Ciclodextrina (HP- β -CD) é uma opção capaz de contornar a solubilidade limitada em água do resveratrol pela formação de uma inclusão com uma lipoxigenase (LU et al., 2009). Após estudos, pesquisadores concluíram que os β -CD podem ser utilizados como sistemas de transporte, uma vez que eles atuam como um reservatório de forma controlada. Além disso, a utilização de *trans*-resveratrol β -CD desacelera o metabolismo no fígado e a eliminação pelos rins, melhorando assim sua biodisponibilidade (LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2006)

Contudo, o desenvolvimento de formulações com características de liberação sustentada que podem, eventualmente, transportar e entregar o resveratrol para locais específicos é uma estratégia promissora abordada através de transportadores coloidais em escala manométrica (WATAL et al., 2013; MUSYANOVCH e LANDFESTER, 2014) Investigar novas alternativas terapêuticas, bem como associar quimioterapia convencional a um composto natural com alto potencial antioxidante poderá contribuir no tratamento da toxoplasmose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi investigar os benefícios do tratamento quimioterápico a base de sulfametoxazol-trimetropim associado ao resveratrol sobre parâmetros comportamentais e de memória, perfil oxidativo/antioxidante, contagem de cistos cerebrais e níveis de citocinas em camundongos infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os parâmetros comportamentais de esQUIVA inibitória, campo aberto e sensibilidade ao choque, em camundongos controles e camundongos infectados com *T. gondii* e/ou tratados com resveratrol nas formas livre, complexo de inclusão e associado ao sulfametoxazol-trimetropim;
- Verificar o perfil oxidativo e o status antioxidante em fígado e cérebro de camundongos controles e infectados com *T. gondii* e/ou tratados com resveratrol livre, complexo de inclusão e associado ao sulfametoxazol-trimetropim;
- Quantificar o número de cistos cerebrais em camundongos infectados com *T. gondii* e/ou tratados com resveratrol livre, complexo de inclusão e associado ao sulfametoxazol-trimetropim;
- Analisar histologicamente fígado de camundongos controles e infectados com *T. gondii* e/ou tratados com resveratrol livre, complexo de inclusão e associado ao sulfametoxazol-trimetropim;
- Determinar o nível de citocinas em soro de camundongos controles e infectados com *T. gondii* e/ou tratados com resveratrol livre, complexo de inclusão e associado ao sulfametoxazol-trimetropim.

3. MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1:

Efeito do sulfamethoxazol-trimetropim associado ao resveratrol no tratamento de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*

Submetido à revista: Parasitology International

**Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim associated with resveratrol to treat mice
infected by *Toxoplasma gondii***

Nathieli B. Bottari^a, Matheus D. Baldissera^b, Alexandre A. Tonin^c, Virginia C. Rech^b, Catiane B. Alves^b, Fernanda D'Avila^b, Gustavo R. Thomé^a, Naiara S. Guarda^d, Rafael N. Moresco^d, Giovana Camillo^e, Fernanda F. Vogel^e, Cristiane Luchese^f, Maria Rosa C. Schetinger^a, Camila Tochetto^g, Rafael Fighera^g, Vivian S. K. Nishihira^b, Aleksandro S. Da Silva^{a,h*}

^aGraduate Program in Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil.

^bHealth Center, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS, Brazil.

^cDepartment of Microbiology and Parasitology, UFSM, Brazil.

^dDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, UFSM, Brazil.

^eDepartment of Preventive Veterinary Medicine, UFSM, Brazil.

^fCenter for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil.

^gDepartment of Veterinary Pathology, UFSM, Brazil.

^hDepartment of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

*Author correspondence: Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Rua Beloni Trombeta Zanin, 680E, Laboratório de Parasitologia Animal, Bairro Santo Antônio, Chapecó, Santa Catarina, Zip 89815-630, Brazil. Email: aleksandro.silva@udesc.br (A.S. Da Silva). Phone and Fax: +55 49 3330-9438

Abstract

This study aimed to investigate the effects of resveratrol associated with sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) to treat mice experimentally infected by *Toxoplasma gondii* considering infection, behavior, and oxidative profile aspects. For the study, 60 mice were initially divided into two groups: uninfected (n=24) and infected by *T. gondii* (n=36). These two groups were later subdivided into groups and treated with resveratrol (free and inclusion complex containing resveratrol) alone and associated with ST: the groups A to D were composed by healthy mice and the groups E to J were consisted of animals infected by *T. gondii* (VEG strain). Treatments began 20 days post-infection for 10 consecutive days with oral doses of 0.5 mg kg⁻¹ of ST (groups B and F), 100 mg kg⁻¹ of free resveratrol (groups C and G) and inclusion complex of resveratrol (inclusion complex containing resveratrol) (groups D and H), and lastly an association of both drugs (groups I and J). Behavioral tests (memory, anxiety and locomotion) were performed after treatment. Liver and brain fragments were collected to evaluate pathological changes, brain cysts counts, as well as oxidant and antioxidant levels. It was observed a reduction on the number of cysts in the brain of animals treated with both drugs associated; there was also reduced number of lesions on both organs. This drug association was also able to reduce oxidative and increase antioxidant levels in infected mice, which might be interpreted as a resveratrol protective effect. In addition, treatment with ST associated to resveratrol was able to prevent behavioral changes. Therefore, the use of both drugs enhances the therapeutic effect acting on a synergic way, reducing the oxidizing effects of chemical treatment for toxoplasmosis.

Keywords: *T. gondii*, animal behavior, resveratrol, oxidants/antioxidants.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is a coccidian parasite belonging to the phylum Apicomplexa, which includes the largest and most important group of obligate parasites [1]. It has a great capacity to parasitize various types of cells and infects almost any warm-blooded animal [2]. Humans and other animals may become infected by *T. gondii* by the ingestion of sporulated oocysts shed in felines feces, which are the definitive hosts [2]. Humans can also become infected by ingesting raw or undercooked meat from infected animals.

It is estimated that about one third of the world population is seropositive for toxoplasmosis [3]. In the acute phase, tachyzoites rapidly invade nucleated cells and begin to replicate. In addition, the parasite may migrate into tissues where they form cysts containing bradyzoites [4]. The parasite can be transmitted even vertically, that is, when the tachyzoites infects the fetus via transplacental [5].

Currently, sulfadiazine is the drug of choice to treat acute toxoplasmosis in humans. However, this drug has some toxicity and causes side effects [6,7]. Studies show that when this compound or similar are associated with antioxidants, there is an increased therapeutic efficacy and a reduction in cell injury when compared to animals treated only with chemotherapy [8]. So, resveratrol was used in this study in the search for a therapeutic drug against toxoplasmosis that could reduce the side effects of ST.

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a polyphenol with high antioxidant potential, naturally found in wine, peanuts, grapes, and other fruits [9,10]. Numerous studies have investigated the attributes of this biological compound which mainly include antioxidant and anti-inflammatory activities, platelet anti-aggregatory effects, anti-atherogenic property, growth inhibition activity, immunomodulation, and prevention [11]. Despite being a powerful antioxidant, resveratrol is easily destroyed by acids and enzymes present in the digestive tract [12]. This implies the need to develop more effective methods to deliver and metabolize this

compound. To that end, the nanocapsules containing resveratrol can be used, as they have a better therapeutic effect when interacting with body tissues on a specific manner with better absorption and controlled release [13]. Based on this information one question arises: does the association of resveratrol with sulfamethoxazole-trimethoprim leads to clinical, immunological and biochemical improvement? Therefore, this study aimed to assess the effects of resveratrol (free and inclusion complex containing resveratrol) associated with sulfamethoxazole-trimethoprim in the treatment of mice experimentally infected by *T. gondii* on the aspects of behavior and oxidative profile.

2. Materials and Methods

2.1. *Toxoplasma gondii* strain and inoculum preparation

T. gondii strain VEG previously kept in liquid nitrogen was inoculated in one mouse (BALB/c). Thirty days later, this animal was humanely euthanized and its brain was homogenated in saline solution. Brain cysts containing bradyzoites were collected and inoculated orally into other five mice. This procedure was done in order to reactivate parasite's virulence. Twenty-five days post-infection (PI), animals were humanely euthanized for brain collection, brain cysts counted, and the inoculum was prepared by homogenizing the brains into saline solution.

2.2. Animal model

Sixty male Swiss mice with a mean age of 60 days weighing 25 ± 5 g were kept in boxes with 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 drinking water *ad libitum*.

2.3. Experimental design

Firstly, 60 animals were divided into two major groups: group A-D (n=24) consisted of healthy uninfected mice, and groups E-J (n=36) of animals infected orally with 50 cysts containing bradyzoites of a cystogenic strain (VEG) of *T. gondii*. After 20 days post-infection (PI), these two groups were divided into 10 subgroups and treatments started. The detailed experimental design is shown in Table 1.

Treatment was given between days 20 – 29 PI. Treatments with sulfamethoxazole-trimethoprim (ST), free and inclusion complex (ICR) containing resveratrol were administered orally for 10 consecutive days at a dose of 0.5mg kg⁻¹ for ST; and 100 mgkg⁻¹ for free and inclusion complex of resveratrol (Table 1). The inclusion complex was provided by the Nanotechnology Laboratory of Franciscan University Center and free resveratrol was marketed (Sigma Aldrich).

2.4. Behavioral tests

2.4.1. Elevated plus-maze (EPM)

This test has been widely used in rodents to measure anxiety [14]. The apparatus consist of two elevated (26 cm high) and open arms (16×5 cm) positioned opposite to one another and separated by a central platform (5×5 cm), and two arms of the same dimension but enclosed by walls (16×5×10 cm) forming a cross. During a 5 min test period, the number of entries either to the open or enclosed arms, plus the time spent in the open arms are recorded. The anxiolytic effectiveness is illustrated by a significant statistical augmentation of parameters in open arms (time and/or entries) [15]. The EPM test was performed at day 30 PI.

2.4.2. Passive avoidance task

Long-term memory (LTM) was investigated using passive avoidance task according to the method of Sakaguchi et al. [16], with modifications in the intensity and exposure time for the electric shock. During the training session, each mouse was placed on the platform. An electric shock (0.5 mA) was delivered for 2 seconds every time the animal completely stepped on the grid floor. LTM tests (thirty days PI) were performed 24 h after training in a similar manner.

2.4.3. Open-field test

The open-field testing apparatus was made of square plywood (40 cm x 40 cm) surrounded by walls of 30 cm high containing marks on the floor made by tape markers, thus, dividing each square into 9 squares (3 rows of 3). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and its movements (number of segments crossed with its four paws) and exploratory activities (expressed by the number of time rearing on its hind limbs) were observed for 4 min [17].

2.5. Sampling

Thirty-one days after the infection, the animals were anesthetized in anesthetic chamber with isoflurane. Shortly after, the animals were euthanized by decapitation, and fragments of liver and brain were collected. Liver fragments were sent for oxidant and antioxidant evaluation after homogenization into appropriate volume of Tris-HCl. The liver homogenate was centrifuged (3500 xg) and the supernatant was collected and stored at -20°C. Liver (all animal per group) and brain (two animals per group) fragments were also separated for histological analyses. The animal brain was removed and separated into two hemispheres. The right hemisphere and liver fragments were homogenized in Tris-HCl buffer separately for oxidants and antioxidants analyses ($n=5$ per group). The left hemisphere of the brain was

used to count the amount of *T. gondii* cysts ($n=5$ per group). In each group, part of the brain of two animals was used for histological study.

2.6. Counting brain cysts

In order to count the amount of *T. gondii* cysts, the left hemisphere of each brain was suspended into salt solution and passed ten times through a 5mL syringe with a 22g needle (0.9 mm). The resulting liquid was centrifuged at 3.000 rpm for 10 minutes at 4°C and the total number of cysts on each brain was determined by microscopic reading of successive aliquots of 500 μ L [18]. Results were expressed by the means, standard deviation and confidence intervals of brain cysts counts (mean \pm SD).

2.7. Tissue levels of oxidant and antioxidant

Antioxidant and oxidative levels in the liver and brain ($n=5$ animal per group) were determined by semi-automated methods. Protein oxidation was quantified by advanced oxidation protein products (AOPP) according to Hanasand et al. [19] and by the total oxidation status (TOS) according to Erel. [20] The AOPP results were expressed as μ mol/g of protein and TOS μ mol H₂O₂ equivalent of protein. Similarly, antioxidant levels were also measured in the liver and brain. The total antioxidant capacity (TAC) was performed according to the technique described by Erel [21] and the determination of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) as described by Benzie and Strain [22]. The results for TAC were expressed in mmol Trolox equivalent/g of protein and FRAP μ mol/g of protein.

2.8. Liver histopathology

After euthanasia, liver fragments (all mice per group) and one right hemisphere and one left (two mice per group) were collected and stored in formalin 10% for histopathological

examinations. Sagittal sections were collected with an interval of 3 mm between the regions for slide mounting, and stained with hematoxylin and eosin.

2.10. Statistical analysis

Normality test was performed and since the results were not normally distributed, they were transformed to logarithms (FRAP and TOS levels). Then, data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan test ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Clinical signs

During the course of the disease, *T. gondii* infected mice showed clinical signs such as bristling approximately 20 days PI. The clinical signs post-treatment remained in all infected groups.

3.1.1 Cysts counts

Brain cyst counts are shown in Figure 1. The group E, represented by *T. gondii* infected and untreated animals, showed a high number of cysts. The same finding was observed in animals infected and treated with free resveratrol (the group G) and inclusion complex of resveratrol (the group H). The ST treatment reduced the number of brain cysts (the group F) but showed no statistical differences compared to the positive control (the group E). The animals that received the combination of ST with free resveratrol (the group I) and with inclusion complex containing resveratrol (the group J) had fewer brain cysts compared to positive control (the group E).

3.2. Behavioral studies

3.2.1. Elevated plus maze (EPM)

No significant behavioral differences (data not shown) between uninfected animals (groups A to D) were observed. Thirty days after infection (after treatment), the percentage of open arm entries of infected mice (the group E) remained higher than in the control group (the group A). Sulfamethoxazole-trimethoprim (the group F), free resveratrol (the group G) and inclusion complex containing resveratrol (the group H) treatments did not reverse the increase in the percentage of open arm entries caused by infection. Combination of ST and free resveratrol completely reduced the percentage of open arm entries caused by infection to normal levels, while treatment with combination of ST and inclusion complex containing resveratrol did not cause any effect (Figure 2).

3.2.2. *Passive avoidance* task

No significant memory differences (data not shown) between uninfected animals (groups A to D) were observed. Thirty days PI treatments with ST, free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol significantly restored the latency time that was decreased on infected mice (Figure 3). Treatment with combination of ST and free resveratrol partially reversed the reduction in the latency time, while treatment with ST associated to inclusion complex containing resveratrol did not cause any effect (Figure 3).

Thirty-one days PI, in the test section, infected animals reduced latency time when compared to the control group. Treatment with only ST and the combination of ST and free resveratrol restored the latency time. Free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol treatments did not have effect on latency time in passive avoidance task (Figure 3).

3.2.3. *Open-field test*

Number of crossings and rearing revealed no significant differences between the groups (data not shown). The lack of results in the Open Field model excludes the anxiolytic effect by repression.

3.3. Oxidants

Oxidants levels, known as AOPP and TOS, in liver and brain are shown in Table 2. AOPP levels in the liver were reduced in the control groups and treated with ST (the group B) and resveratrol (the group C) in relation to the group control (the group A), therefore, the treatments used altered the antioxidant levels in healthy animals. Infected animals showed increased levels of AOPP in the liver compared to the control group (the group A). Infected and treated animals (groups F, G, and H) showed increased levels of TOS in the liver compared to the control group (the group A). In the combination of free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol with ST (the group I) there was a reduction in the AOPP levels in the liver, which may suggest that the association of chemical therapy presents better results than the free form. In the brain, the AOPP did not differ statistically in uninfected and treated animals (groups B, C and D) compared to the negative control (the group A). TOS levels were reduced in the infected animals and treated with ST (the group F), resveratrol (the group G) and inclusion complex containing resveratrol (the group H) compared to the negative control (the group A). The combination of free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol with ST caused the levels of AOPP and TOS to increase in both groups (the groups I and J) compared to control (the group E).

3.4. Antioxidants

The results of antioxidant levels, markers known as TAC and FRAP, in brain and liver are shown in Table 3. Levels of TAC in liver homogenates did not differ between healthy and treated animals (groups A to D). The levels of FRAP in liver homogenates increased in infected animals (group E), in infected animal treated with free resveratrol (the group G), and animals infected but treated with ST associated with free resveratrol (the group I) and inclusion complex containing resveratrol (the group J) compared to control animals (the group A).

TAC levels decreased in *T. gondii* infected animals that have received ST (the group F) and inclusion complex containing resveratrol (the group G) compared to the control group (the group E). The association of ST with inclusion complex containing resveratrol increased the levels of TAC (the group J), but the data from animals treated with resveratrol in combination with ST (the group I) showed no statistical differences. The levels of FRAP were lower in all treated and infected animals (groups G, H, I and J) compared to the positive control (the group E).

In the brain, the TAC and FRAP levels were not different in uninfected and treated groups (groups B, C and D) and *T. gondii* infected treated (groups E, F, G, H) compared to the negative control (the group A). However, the association of ST and free resveratrol (the group I), and ST with inclusion complex containing resveratrol (the group J) led to increased TAC levels in the brain when compared to the control group (the group A).

Liver FRAP levels were lower in animals receiving ST (the group F) and resveratrol (the group C) compared to the control group (the group A). The association of ST with free resveratrol (the group I) and inclusion complex (the group J) caused decrease and increase, respectively, on the FRAP levels compared to the control group (the group A).

3.5. Histology

The animals used as negative control (groups A-D) showed no histological changes in the liver, interestingly since the opposite occurred in the other infected groups. Animals in the group E (positive control) showed random foci of necrosis and marked inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, plasma cells, epithelioid macrophages and adjacent fibroblasts (granuloma), and periportal infiltration of macrophages and neutrophils (Figure 4-A). The animals infected and treated only with ST (group F) show moderate random multifocal lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate in the parenchyma and portal space (Figure 4-B). Similar changes were also observed in the animals treated with free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol (groups G and H), as well as in the association with ST (groups I and J), however, in these groups the observed inflammatory infiltrate was mild (Figure 4-C). In all *T. gondii* infected groups (treated or untreated) there were parasitic cysts (Figure 4-D), and small foci inflammatory infiltrate without apparent difference between groups.

4. Discussion

It is well-known that latent toxoplasmosis can cause emotional and personality changes, and intelligence impaired due to the fact that the parasite targets brain cells of the host [23]. Therefore, the *T. gondii* infection in mice represents a key model for behavioral studies. Studies suggest that *T. gondii* alters the behavior of rodent hosts, increasing the chance of being predated by cats [24,25]. These findings are compatible with the results found in this study, where animals infected by *T. gondii* explore the open arms more times during the elevated cross maze test, demonstrating an anxiolytic effect as the disease progressed (30 days PI). When administering free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol in combination with ST, the animals reduced their anxiolytic behaviour, since they spent less time inside the maze and went fewer times to the open arms.

Results regarding the short and long-term memory show a significant reduction in all animals experimentally infected by *T. gondii*. The observed effect may be associated with the encysted brain area. The association of resveratrol (free or inclusion complex form) associated with ST, lead to memory improvement, especially in the inclusion complex containing resveratrol probably because this formulation releases the drug slowly, continuously, and in targeted regions of the brain unlike the free form that is rapidly metabolized [26]. Sulfamethoxazole-trimethoprim, free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol had no isolated effect and they have not been able to reduce the number of brain cysts.

Evaluation of oxidant and antioxidant levels in the liver and brain showed that ST and resveratrol, both in free and combined forms, were able to reduce the levels of hepatic AOPP. This result can be explained by the cytochrome enzyme system P450 (CYP), which is responsible for the oxidative metabolism of hundreds of drugs [27,28], among them the sulfadiazine isoform C9. The low expression of CYP by the action of sulfa on the cytochrome P450 is associated with decreased cell viability leading to necrosis and apoptosis [29-31]. In the liver, resveratrol in its free form or associated to ST, and in its inclusion complex containing resveratrol led to increased levels of AOPP, because resveratrol is a powerful antioxidant metabolized in the hepatic cells and *T. gondii* infected animals are able to synthesize reactive intermediates products (RNI) involved in parasite replication [32]. In contrast, the inclusion complex containing resveratrol in combination with ST did not change the values of AOPP when compared to the negative control, as demonstrated by a study by Csiszár et al. [33] This study verified that the resveratrol is capable of preventing damage related to oxidative stress in pathophysiological conditions, especially when encapsulated in inclusion complex, due to its well established antioxidant action. Both associations of free and inclusion complex containing resveratrol with ST, cause an increase in the levels of AOPP and TOS in the brain (indicators of cell injury), which might be a result from parasite

phagocytosis by the macrophages, since the treatment was more effective when these drugs were associated, showing a reduced number of cysts. The increased levels of TOS in the liver and its reduced levels in the brain are due to cellular remodeling process performed by the *T. gondii* when absorbing the nutrients required for its growth, thereby reducing the availability of amino acids in brain tissue [34]. The TAC and FRAP levels in liver and brain, respectively, were increased in mice infected by *T. gondii*, which may be a consequence of oxidants increase in this study. Another explanation, according to Kwok et al. [35] is that the parasite has an intrinsic antioxidant system through the expression of catalase, similarly activated by the host during oxidative response which may explain the increased antioxidant levels found in infected animals. The free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol, combined with ST were also able to increase the antioxidant levels in these structures, which is probably an antioxidant effect of resveratrol that protects the host's immune system against the reactive species produced by *T. gondii* as demonstrated in the oxidants results.

A recent study by our research group found that *T. gondii* infection is capable of modulating enzymatic activities (creatine kinase and acetylcholinesterase) responsible for neurotransmitters (ATP and ACh) control in the brain. In addition, we have found that the treatment with ST and resveratrol can reverse such enzymatic changes [36], which can be related to mice behavioral alterations reported in this study.

This study shows benefits of the conventional chemical therapy associated with a natural product such as resveratrol, since treated animals that have received the combination of resveratrol with sulfamethoxazole-trimethoprim showed fewer brain cysts, and lesser behavioral changes related to anxiety and memory impairment or absent. The treatment was efficient to modulate the oxidative/anti-oxidant status, and to increase the levels of antioxidants with a protective effect to the infected animals. Overall, it is possible to conclude

that the suggested therapeutic protocol shows direct benefits in the treatment of toxoplasmosis and great potential to treat the disease.

Ethics Committee. The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of the Universidade do Estado de Santa Catarina in November 8th, 2013 under protocol number 01.52.13.

Acknowledgements. We thank CAPES for the financial assistance granted to the first author (Scholarship). The project was funded with internal resources of the Graduate Program in Biochemistry Toxicology and Laboratory of Clinical and Toxicological Analysis.

References

- [1] Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 607–623.
- [2] Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2 rd. CRC Press, Boca Raton, 2012.
- [3] Tender AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1217–1258.
- [4] Dubey JP, Shen SK, Kwok OC, Frenkel JK. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. *J Parasitol* 1999; 85: 657–662.
- [5] Figueiro-Filho EA, Lopes AHA, Duarte G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 27: 442-449.

- [6] De Souza W, Duarte ESM, Urbina JA, Vommaro RC. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 59–65.
- [7] Lopes FMR, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Braz J Infect Dis* 2007; 11, 5.
- [8] Barbosa C, Tonin AA, Faccio L, Da Silva AS, Vogel F, Rue M. Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation. *Parasitol* 2014; 141:1761-8
- [9] Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol: Heart Circul Physiol* 2002; 282: 1996-2003.
- [10] Frémon L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000; 66: 663–673.
- [11] De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156–1160.
- [12] Watal G, Watal A, Rai PK, Rai DK, Sharma G, Sharma B. Biomedical applications of nano-antioxidant. *Meth Mol Biol* 2013; 1028: 147-51.
- [13] Musyanovych A, Landfester K. Polymer Micro- and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties. *Macromol Biosci* 2014; 14: 458-477.
- [14] Pellow P, Chopin SE, File M, Brile Y. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 1982; 14: 149–167.
- [15] Clénet F, Bouyon E, Hascoet M, Bourin M. Light/dark cycle manipulation influences mice behavior in the elevated plus maze. *Behav Brain Res* 2006; 166: 140–9.
- [16] Sakaguchi M, Koseki M, Wakamatsu M, Matsumura E. Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 530: 81–87.

- [17] Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull* 1976; 83: 482–504.
- [18] Dumas JL et al. Evaluation of the efficacy of prolonged administration of azithromycin in a murine model of chronic toxoplasmosis. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 111-118.
- [19] Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Goransson LG, Brede C. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta* 2012; 413, 901–906.
- [20] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38: 1103–1111.
- [21] Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2005; 37: 277–285.
- [22] Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
- [23] Flegr J, Preiss M, Klose J, Hávlicek J, Vitakova M, Kodym P. Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis? *Biol Psychol* 2003; 63: 253–68.
- [24] Webster JP, Brunton CFA, MacDonald DW. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behavior in wild brown rats, *rattus norvegicus*. *Parasitol* 1993; 109: 37–43.
- [25] Queiroz ML, Viel TA, Papa CHG, Lescano SAZ, Chieff PP. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* coinfecting by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013; 55: 51-53.
- [26] Frozza RL, Bernardi A, Hoppe JB, Meneghetti AB, Battastini AM, Pohlmann AR, Guterres SS, Salbego C. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9: 2086-104.

- [27] Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O. Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 1965; 147: 400-402.
- [28] Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 70-83.
- [29] Wu D, Cederbaum AI Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcoholism: Clin Exp Res* 2001; 25: 619-628.
- [30] Borlak J, Thum T. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *J Fed Am Soc Exp Biol* 2002; 16: 1537-1549.
- [31] Butura A, Nilsson K, Morgan K, Morgan TR, French SW, Johansson I, Schuppe-Koistinen I, Ingelman-Sundberg M. The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model. *J Hepatol* 2009; 50: 572-583.
- [32] Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, Van Furth R. IFN-gamma induced l-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992; 148: 568-574.
- [33] Csiszár A, Csiszar A, Pinto JT, Gautam T, Kleusch C, Hoffmann B, Tucsek Z, Toth P, Sonntag WE, Ungvari Z. Resveratrol encapsulated in novel fusogenic liposomes activates Nrf2 and attenuates oxidative stress in cerebrovascular endothelial cells from aged rats. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 2014; 69: doi:10.1093/gerona/glu029.
- [34] Gaskell EA, Smith JE, Pinney JW, Westhead DR, McConkey GA. A Unique Dual Activity Amino Acid Hydroxylase in *Toxoplasma gondii*. *Plos one* 2009; 4: 3.
- [35] Ding M, Kwok LY, Schlüter D, Clayton C, Soldati D. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Mol Microbiol* 2004; 51: 47-61.

- [36] Bottari NB, Baldissera MD, Tonin AA, Rech VC, Nishihira VSK, Thomé GR, Schetinger MRC, Morsch VM, Camillo G, Vogel FF, Tochetto C, Figuera R, Machado G, Stefani LM, Da Silva AS. Sulfamethoxazole-trimethoprim associated with resveratrol for the treatment of toxoplasmosis in mice: influence on the activity of enzymes involved in brain neurotransmission. *Microb Pathog* 2015;79C: 17-23.

Table 1: Description of the experimental design used in this study: number of animals and details of treatments.

Groups	Number of mice	Description of the treatments
A	06	Untreated and uninfected healthy mice (negative control)
B	06	Uninfected animals that received sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) orally
C	06	Uninfected animals orally treated with resveratrol on its free form
D	06	Uninfected animals and treated orally with complex inclusion of resveratrol (inclusion complex containing resveratrol)
E	06	Mice infected with <i>T. gondii</i> and untreated (positive control)
F	06	Infected animals and treated with ST
G	06	Infected animals and treated with resveratrol on its free form
H	06	Infected animals treated with complex inclusion of resveratrol (inclusion complex containing resveratrol)
I	06	Infected animals and treated with ST associated with resveratrol on its free form
J	06	Infected animals and treated with ST combined with complex inclusion of resveratrol (inclusion complex containing resveratrol)

Note: Doses of 0.5mg kg⁻¹ for ST; 100 mg kg⁻¹ for free, and 100 mg kg⁻¹ complex inclusion of resveratrol.

Table 2: Evaluation of the oxidant level in liver and brain of mice experimentally infected with *T. gondii* treated with resveratrol in its free and inclusion complex form and in association with sulfamethoxazole-trimethoprim.

Groups	AOPP ($\mu\text{mol/g}$ of protein)		TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/ g of protein)	
	Liver	Brain	Liver	Brain
A	5.76 ^{cd} (± 1.12)	14.8 ^b (± 2.8)	1.95 ^d (0.09)	5.90 ^b (± 2.1)
B	4.78 ^e (± 0.97)	12.4 ^{bc} (± 4.7)	1.82 ^d (± 0.61)	4.29 ^{bc} (± 1.2)
C	5.19 ^e (± 1.32)	15.2 ^b (± 2.7)	2.13 ^c (± 0.72)	5.27 ^b (± 1.6)
D	5.52 ^d (± 1.41)	12.5 ^{bc} (± 2.4)	1.97 ^{cd} (± 0.84)	3.88 ^c (± 1.8)
E	7.03 ^{ab} (± 0.68)	12.1 ^c (± 1.9)	3.81 ^a (± 1.02)	4.35 ^{bc} (± 0.9)
F	7.24 ^{ab} (± 1.24)	10.9 ^c (± 2.4)	2.76 ^{bc} (± 0.70)	4.21 ^{bc} (± 2.2)
G	7.88 ^a (± 1.80)	10.6 ^c (± 2.1)	2.37 ^c (± 0.67)	5.15 ^b (± 2.5)
H	6.89 ^{bc} (± 0.55)	11.8 ^c (± 2.5)	2.48 ^{bc} (± 1.03)	4.85 ^b (± 1.3)
I	3.55 ^f (± 1.11)	23.9 ^a (± 5.4)	1.63 ^d (± 0.91)	15.9 ^a (± 4.7)
J	6.10 ^{cd} (± 1.73)	26.7 ^a (± 7.1)	3.10 ^{ab} (± 0.47)	14.8 ^a (± 3.1)

Note: same letters in the same column do not differ statistically from each other, 5% (Mean \pm SD). Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), B (uninfected and treated with Sulfamethoxazole-Trimethoprim (ST)), C (uninfected and treated with Free Resveratrol (FR)), D (uninfected and treated with Inclusion complex of Resveratrol (ICR)), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and ICR).

Table 3: Evaluation of antioxidant levels in liver and brain of mice infected experimentally with *T. gondii* under resveratrol chemotherapy on its free and inclusion complex form and in combination with sulfamethoxazole-trimethoprim.

Groups	TAC (mmol Trolox Equivalent/g of protein)		FRAP (μ mol/g of protein)	
	Liver	Brain	Liver	Brain
A	0.25 ^c (\pm 0.09)	0.13 ^{bc} (\pm 0.06)	72.4 ^b (\pm 12.7)	208.6 ^{cd} (\pm 47.3)
B	0.22 ^c (\pm 0.05)	0.18 ^b (\pm 0.04)	66.4 ^c (\pm 17.2)	217.5 ^c (\pm 29.8)
C	0.26 ^c (\pm 0.07)	0.14 ^b (\pm 0.09)	71.6 ^c (\pm 10.4)	210.6 ^c (\pm 52.9)
D	0.24 ^c (\pm 0.02)	0.12 ^{bc} (\pm 0.05)	75.4 ^{bc} (\pm 9.7)	201.3 ^{cd} (\pm 39.7)
E	0.59 ^b (\pm 0.08)	0.16 ^b (\pm 0.06)	99.4 ^a (\pm 17.6)	190.0 ^{cd} (\pm 27.6)
F	0.30 ^c (\pm 0.07)	0.09 ^c (\pm 0.05)	76.5 ^{bc} (\pm 8.9)	179.2 ^d (\pm 56.7)
G	0.67 ^b (\pm 0.12)	0.12 ^{bc} (\pm 0.07)	81.9 ^b (\pm 17.2)	217.7 ^c (36.4)
H	0.19 ^c (\pm 0.06)	0.16 ^b (\pm 0.03)	82.4 ^b (\pm 7.8)	162.5 ^d (\pm 57.9)
I	0.70 ^b (\pm 0.24)	0.33 ^a (\pm 0.19)	50.5 ^d (\pm 6.9)	389.7 ^a (\pm 84.9)
J	1.82 ^a (\pm 0.51)	0.25 ^{ab} (\pm 0.17)	72.9 ^c (\pm 12.4)	259.5 ^b (38.4)

Note: same letters in the same column do not differ statistically from each other, 5% (Mean \pm SD). Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), B (uninfected and treated with Sulfamethoxazole-Trimethoprim (ST)), C (uninfected and treated with Free Resveratrol (FR)), D (uninfected and treated with Inclusion Complex of Resveratrol (ICR)), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and ICR).

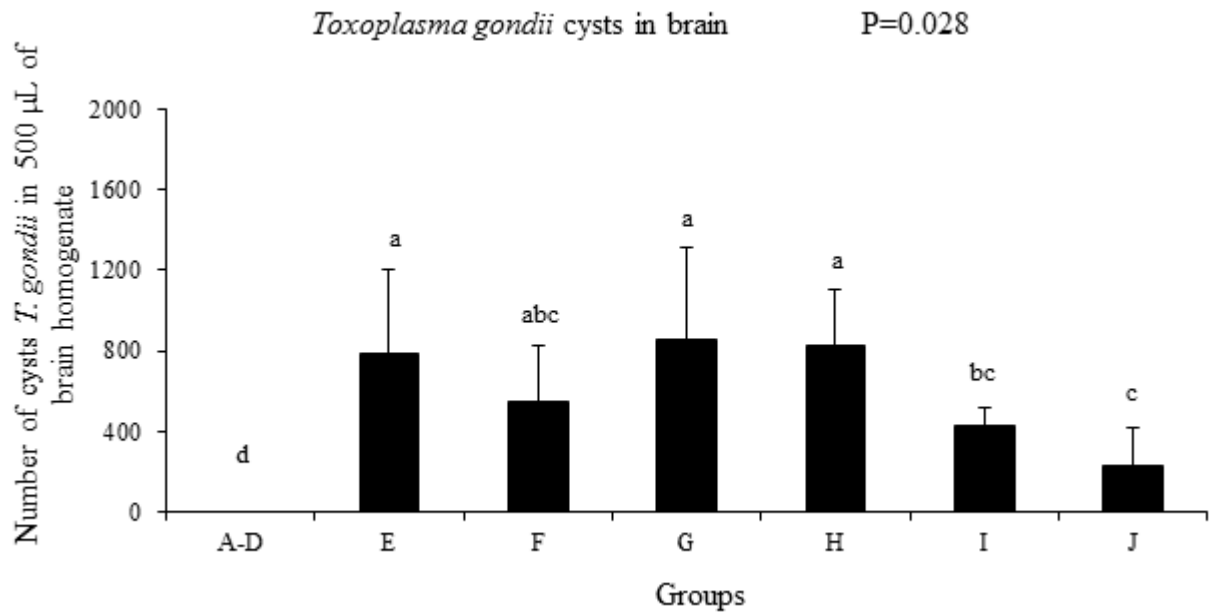


Figure 1: Numbers of cysts in the brain of mice infected by *T. gondii* after treatment with resveratrol free, inclusion complex containing resveratrol and in association with sulfamethoxazole-trimethoprim. Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), B (uninfected and treated with Sulfamethoxazole-Trimethoprim (ST)), C (uninfected and treated with Free Resveratrol (FR)), D (uninfected and treated with Inclusion complex of Resveratrol (ICR)), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and NCR). Note: Means \pm standart error followed by the same letters are not statistically different ($P>0.05$).

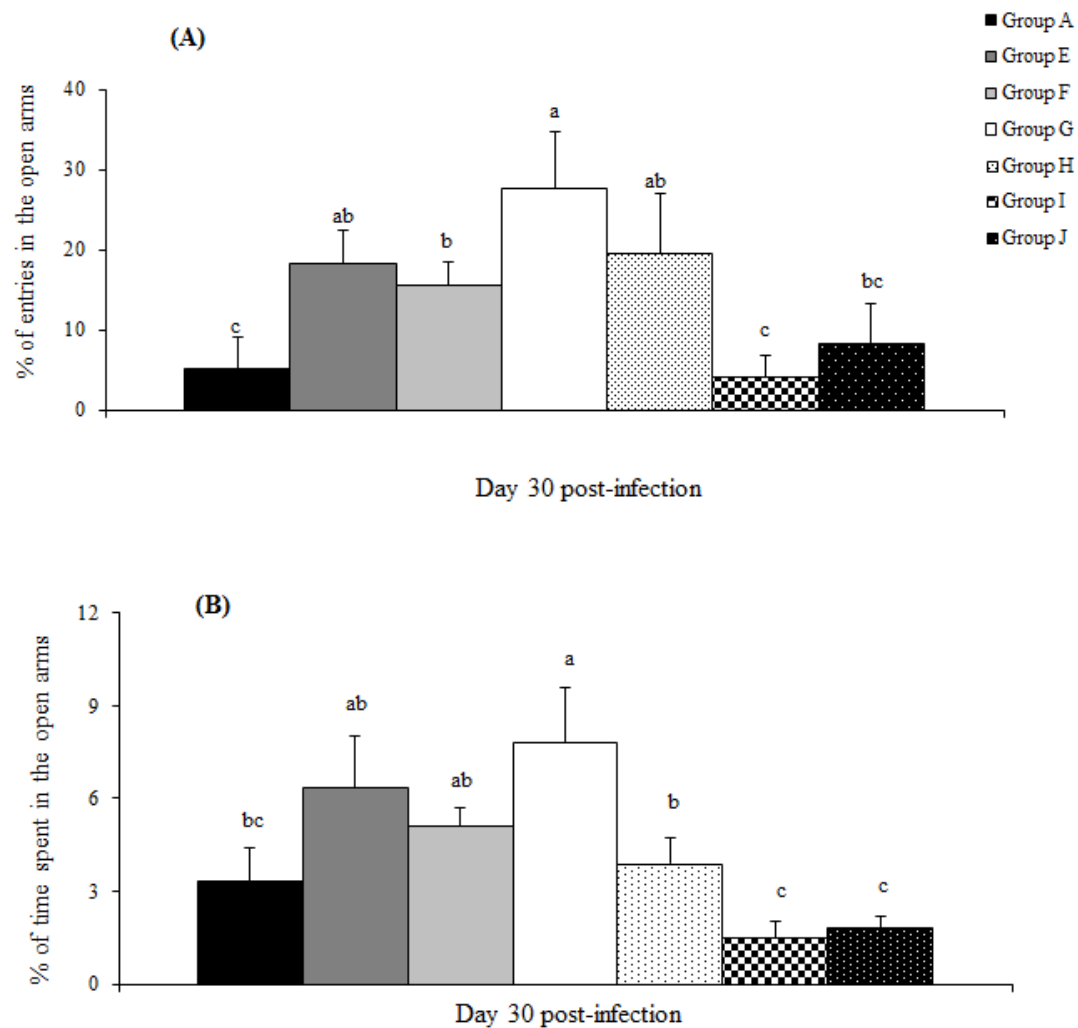


Figure 2: Behavioral assessment of mice experimentally infected with *T. gondii* by elevated plus-maze. Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and ICR). (A) effect of infection on the percentage of open arm entries and of time spent in open arms (B). Infected mice presented an increase in the percentage of open arm entries and in time spent in open arms (B), when compared to the non-infected mice (control group). Note: Means \pm SD followed by equal letters in the same graph not statistically different ($P > 0.05$).

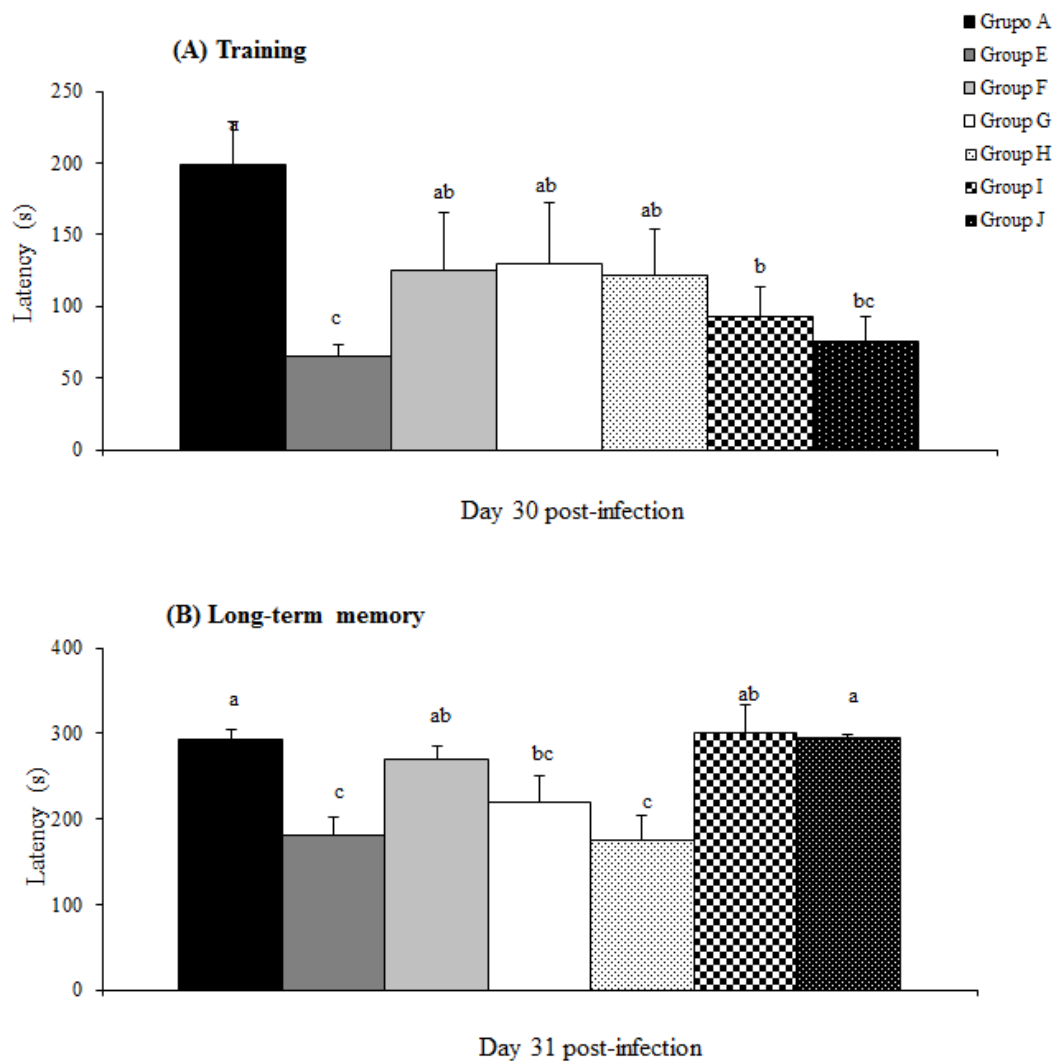


Figure 3: Behavioral assessment of mice experimentally infected with *T. gondii* showing reduced latency time when compared to the control group (non-infected animals). Groups: A (untreated and uninfected healthy mice), E (infected and untreated), F (infected and treated with ST), G (infected and treated with FR), H (infected and treated with ICR), I (infected and treated with ST and FR), and J (infected and treated with ST and ICR). (3A) Training (day 30 post-infection (PI)) and long-term memory (day 31 PI) (3B) of mice post-treatment with sulfamethoxazole-trimethoprim, free and inclusion complex resveratrol and significantly restored the latency time that was previously decreased in mice infected. Note: Means \pm SE followed by the same letters are not statistically different ($P > 0.05$).

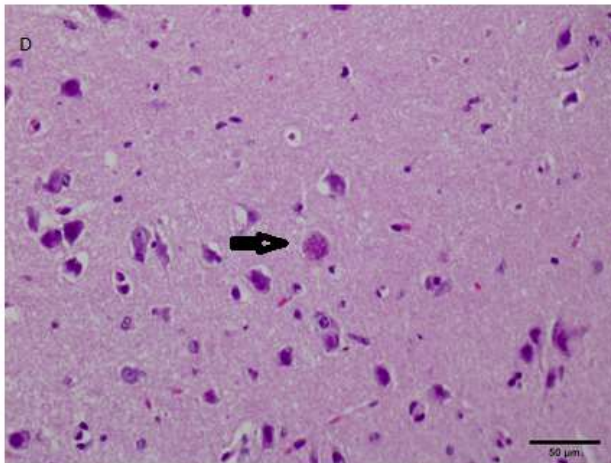
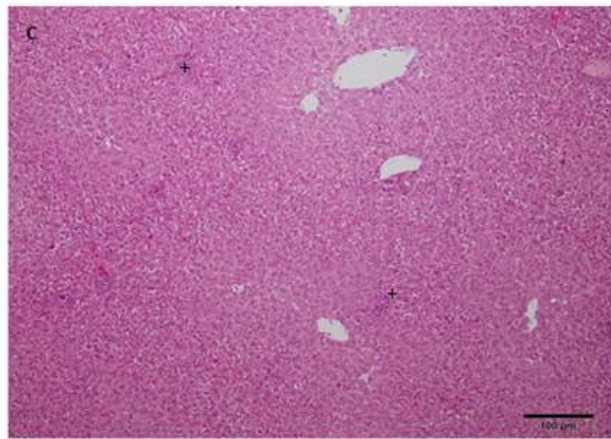
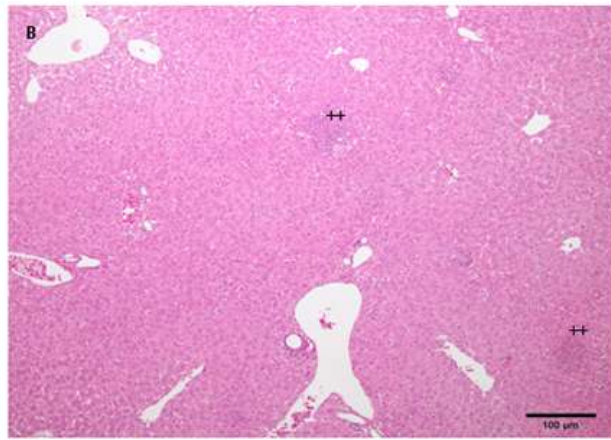
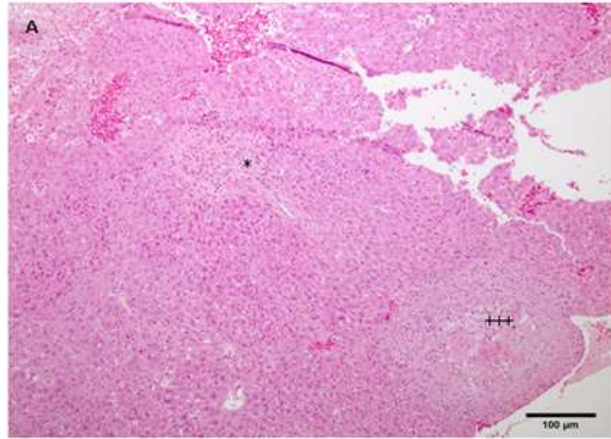


Figure 4. Liver and brain histopathology of *T. gondii* infected mice. (A) Samples from group E showing random foci of necrosis (*) and high inflammatory infiltrate (+ + +). (B) Animals treated with sulfamethoxazole-trimethoprim (Group F) with moderate inflammatory infiltration (++). (C) All animals treated with free resveratrol (Group G), inclusion complex resveratrol (Group H) and both (Groups I and J) showing mild inflammatory infiltration (+). (D) *T. gondii* cysts in mouse brain (arrow).

3.2 Manuscrito 2

Efeitos do tratamento com sulfamethoxazol-trimetropin associado ao resveratrol nos níveis de citocinas de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*

Submetido à revista: Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

Effects of treatment with sulfamethoxazole-trimethoprim associated to resveratrol on cytokines levels of mice infected by *Toxoplasma gondii*

Nathieli B. Bottari^a, Matheus D. Baldissera^b, Alexandre A. Tonin^c, Virginia C. Rech^b, Vivian S.K. Nishihira^b Gustavo R. Thomé^a, Giovana Camillo^d, Fernanda F. Vogel^d, Marta M.M.F. Duarte^e, Maria Rosa C. Schetinger^a, Vera M. Morsch^a, Camila Tochetto^f, Rafael Fighera^f, Aleksandro S. Da Silva^{a,g*}

^aGraduate Program in Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria(UFSM), Brazil.

^bLaboratory of Nanosciences, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Department of Microbiology and Parasitology, UFSM, Brazil.

^dDepartment of Preventive Veterinary Medicine, UFSM, Brazil.

^e Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, Brazil.

^fDepartment of Veterinary Pathology, UFSM, Brazil.

^gDepartment of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

*Author correspondence: <nathieli_bb@hotmail.com (N.B. Bottari) and

dasilva.aleksandro@gmail.com (A.S. Da Silva)

Abstract. The aims of this study were to investigate the effects of resveratrol on its free form and complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) when associated with sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) on cytokines levels of mice experimentally infected by *Toxoplasma gondii*. For the study, 60 mice were initially divided into two groups: uninfected (n=24) and infected by *T. gondii* (n=36). These two groups were later subdivided into groups and treated with resveratrol (free and inclusion complex containing resveratrol) alone and associated with ST: the groups A to D were composed by healthy mice and the groups E to J were consisted of animals infected by *T. gondii* (VEG strain). Treatments began 20 days post-infection for 10 consecutive days with oral doses of 0.5 mg kg⁻¹ of ST (groups B and F), 100 mg kg⁻¹ of free resveratrol (groups C and G) and inclusion complex of resveratrol (inclusion complex containing resveratrol) (groups D and H), and lastly an association of both drugs (groups I and J). On day 31 PI, blood samples were collected in order to evaluate the cytokine profile. The results showed that on mice of group E there was a increase (P<0.001) in the pro-inflammatory cytokines, while IL-10 reduced when compared with group A. Additionally, there was an increased level of IL-4 and IFN- γ in animals of groups C and D, respectively (P<0.05). Animals of group B showed reduced levels of IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , and IFN- γ (P<0.05). Mice infected and treated (groups F-J) showed increased levels of pro-inflammatory cytokines along with a reduction of IL-10. Treatment with the combination of drugs (group J) led to a protective effect, i.e. reduction in pro-inflammatory cytokines. Therefore, resveratrol, when combined with ST, was able to modulate the serum cytokines profile and moderates the tissue inflammatory process in *T. gondii* infection.

Keywords: *T. gondii*, resveratrol, cytokines, immunomodulation.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is a coccidian parasite that infects almost any warm-blooded animal [1], which includes the largest and most important group of obligate parasites [2]. Mammals may become infected by *T. gondii* by the ingestion of sporulated oocysts shed in the faeces of felids, which are the definitive hosts [3]. For humans, other forms of infection are epidemiologically important such as ingesting raw or undercooked meat from infected animals. Thus, it is estimated that about one third of the world population is seropositive for toxoplasmosis [4]. The treatment of choice for toxoplasmosis in humans has been sulfadiazine, a drug that has some toxicity and causes undesirable side effects [5,6]. Synergism in association antiprotozoal and antioxidant in the treatment of toxoplasmosis was observed, and thus increased therapeutic efficacy and a reduction in cell injury [7].

Resveratrol is a polyphenol naturally found in grapes, wine and peanuts [8,9]. It has several biological properties, as mainly antioxidant and anti-inflammatory activities and antiplatelet effects [10-12]. The inclusion complexes containing resveratrol can be used, as they have a better therapeutic action when interacting with tissue-specific, better absorption and controlled release [13], maintaining, or enhancing the same properties of the free resveratrol.

Exacerbated inflammatory response in infection by *T. gondii* is widely described, and this process is able to increase the cellular and tissue lesions. According to literature, *T. gondii* infection stimulates the production of high levels of cytokines, such as IL-12 and IFN- γ , through cells of the innate immune system [14]. In a recent study, sulfadiazine and selenium were used in association and it modulates the cytokine release in mice infected by *T. gondii* [15]. Similarly, resveratrol also has immunomodulatory and anti-inflammatory properties described [16]; thus, the objective of this study was assess the effects resveratrol in its free

and complexed with HP β CD in association with ST on cytokine modulation, treating mice experimentally infected with *T. gondii*.

2. Material and Methods

2.1. *Toxoplasma gondii* strain and preparation of inoculum

T. gondii, strain VEG, kept in liquid nitrogen was inoculated in one mouse (BALB/c) and thirty days later, its brain was collected and homogenized in saline solution. Cysts containing bradyzoites were collected and inoculated orally in other five mice. This procedure was performed in order to reactivate the parasite virulence. Twenty-five days post-infection (PI), the mice were euthanized for brain collection, cysts counting and preparation of inoculum, for further experimental procedures.

2.2. Experimental design

Sixty male (BALB/c) mice with a mean age of 60 days and weighing 25 ± 5 g were kept in boxes with 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 drinking water *ad libitum*. Firstly, 60 animals were divided into two major groups: group A-D (n=24) consisted of healthy uninfected mice, and groups E-J (n=36) of animals infected orally with 50 cysts containing bradyzoites of a cystogenic strain (VEG) of *T. gondii*. After 20 days post-infection (PI), these two groups were divided into 10 subgroups, and began treatment for 10 consecutive days.

Animal grouping was set randomly, as follows: Animals of groups A to D were not infected; Thus, animals of group A (n=6) did not receive any kind of treatment, representing the negative control, while mice of group B (n=6) received sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) orally; Group C (n=6) and D (n=6) were orally treated with resveratrol on its free form

(C) and resveratrol-HP β CD complex (D). On the other hand, mice from groups E to J were infected with *T. gondii*, as described above. Thus, animals of group E (n=6) were untreated, representing the positive control. The other groups, besides the infection, received different types of treatment; Mice of group F (n=6) were treated with ST, while animals of group G (n=6) were treated with resveratrol on its free form, and mice of group H (n=6) received resveratrol-HP β CD complex; Animals of group I (n=6) were treated with ST in association with free form of resveratrol; Finally, mice of group J (n=6) were treated with ST in combination with resveratrol-HP β CD complex.

Treatments with ST, free resveratrol and resveratrol-HP β CD complex were administered orally for 10 consecutive days at a dose of 0.5 mg kg⁻¹ (ST) and 100 mg kg⁻¹ (free and complex inclusion of resveratrol), individually (groups B, C, D, F, G and H) or in association (groups I and J). The periods of treatment and doses were defined in a previous pilot study. The inclusion complex was provided by the Nanotechnology Laboratory of Franciscan University Center and free resveratrol was marketed (Sigma Aldrich).

2.3. Sampling and histological analysis

Thirty-one days after the infection, the animals were anesthetized and euthanized according to the standard protocol approved by the Welfare Committee. Blood was collected from all the mice, and centrifuged in order to obtain the serum. Sera samples were stored at -20°C for further cytokine levels assessment. Additionally, fragments of liver were collected and stored in formalin 10%, in order to perform histology. Sagittal sections were prepared with an interval of 3 mm between the regions, for slide mounting and staining through hematoxylin and eosin.

2.4. *Serum cytokine levels*

Quantification of the following cytokines was performed: tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (INF- γ), and interleukins (IL-1, IL-4, IL-6, and IL-10) by ELISA assay using commercial kit (Quantikine Immunoassay kits - R&D Systems, Minneapolis, MN), according to the manufacturer's instructions.

2.5. *Statistical analysis*

Normality test was performed and the results were not normally distributed were transformed to logarithms. Then, data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan test ($P < 0.05$).

3. Results

During the course of the disease, mice infected with *T. gondii* showed clinical signs such as apathy and bristling coat, especially from the 20 days PI. The clinical signs remained post-treatment in all infected groups. The histological analysis showed different gradients of parasitic cyst and liver damage in infected animals, e.g: animals of group E showed random foci of necrosis and high granulomatous inflammatory infiltrate. On the other hand, mice groups F, G and H showed moderate random multifocal lymphoplasmacytic inflammatory infiltration, in the parenchyma and portal space. Observing groups I and J, it was possible to observe a milder inflammatory infiltrate, in other words, liver of animals of groups I and J had less and smaller areas with foci of inflammatory infiltrates, when compared with group E (Fig. 1)

The assessment of cytokines (IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , INF- γ , and IL-10) levels is shown in Table 1. As a general rule, there was an increase in the levels of pro-inflammatory cytokines in infected animals (groups E to J) when compared with healthy animals (Group A).

The opposite pattern was observed with IL-10 (anti-inflammatory cytokine), showing reduced levels in infected animals, when compared with healthy animals ($P < 0.05$).

Resveratrol in its free form (Group C) and resveratrol-HP β CD complex (Group D) did not affect the majority of pro-inflammatory cytokine profile in uninfected animals, when compared with the negative control (Group A). On group C there was an increase in TNF- α and INF- γ levels, by the other hand, the group D decrease IL-4 levels. IL-10 had an increase in the serum of uninfected animals (Group C and D), when related to the negative control (group A). Mice uninfected and treated with ST (Group B) showed reduced levels of IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , and IFN- γ , when compared with healthy animals (Group A).

Mice infected by *T. gondii* and treated with ST (group F) and free resveratrol (Group G), or resveratrol-HP β CD complex (Group H), as well as with the association ST and free resveratrol (Group I) presented a decrease levels of pro-inflammatory cytokines, when compared with group E. In opposition, the IL-10 significantly increase in this groups. The association of the ST with resveratrol-HP β CD complex (group J) significantly decreased the levels of pro-inflammatory cytokines and increased IL-10, when compared with the positive control (group E), demonstrating a potential protective effect when in combination.

4. Discussion

T. gondii infection normally results in the induction of an immune response with production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, in order to cope the infectious process [17]. Our results showed an increase in the release of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-4, IL-6, IFN- γ , and TNF- α) along with a decreased release of anti-inflammatory cytokine (IL-10) in animals infected by *T. gondii*. Increased levels of IFN- γ and TNF- α activates macrocytic cells, inducing an immune response of the host against the parasite, i.e. controlling tachyzoite replication during acute and chronic phases of infection

[18,19]. This immunological process contributes to the development of tissue injury [20], as shown by the results of our histopathologic study on liver samples of animals infected by *T. gondii* infected animals. The liver samples of these mice showed foci of necrosis and extensive inflammatory infiltration, consisting of lymphocytes and macrophages. It is an expected finding that probably consists in a response to tachyzoite proliferation and to the intense mononuclear cell products [21].

Literature shows that the combination of sulfadiazine and selenium, treating mice infected with *T. gondii*, also changed cytokine levels [15], similarly to our findings in this present study. Complementing these reported results, our findings revealed that sulfamethoxazole-trimethoprim administered to uninfected animals presented an anti-inflammatory effect, i.e. reducing interleukins (1, 4 and 6), IFN- γ , and TNF- α . Additionally, it was observed what the treatment with ST, in infected animals (groups F, I and J), induced a lower level of pro-inflammatory cytokines assessed in serum, when compared with infected and untreated mice, which is similar to that reported by Barbosa et al. [15]. Therefore, the treatment with ST, by itself, is capable of reducing cytokine levels in healthy animals, such as mice infected with *T. gondii*, also leading to a mild immunosuppressive action, a fact already describe by other authors [22,23]. There is a study reporting that the monotherapy with ST reduced the serum levels of soluble IL-2 receptor and IL-6, and thus, suggesting that ST may inhibit T cell activation and may suppress cytokine production [24]. According literature, a high concentration of ST inhibits postphagocytic H₂O₂ production by neutrophils *in vitro* [25]. Therefore, these mechanisms may explain the reduction of cytokines release in animals receiving chemotherapy; and ST, during toxoplasmosis, may act as antiprotozoal promoting immunomodulation and reducing the inflammatory processes in parasitized tissue, therefore, promoting a beneficial effect for the host. Yang et al. [26] reported the action of resveratrol on reducing pro-inflammatory levels and cell damage, similar current study.

IL-10 plays a key role in the regulation of many functions of the immune system by inhibiting the proliferation of B and T lymphocytes [27], and as preventing excessive tissue damage during the initial phase of the infection by *T. gondii*. In our study, IL-10 levels decreased in the infected and untreated mice, acting as an anti-inflammatory cytokine. However, these infected animals, when treated with ST and/or resveratrol, had IL-10 levels increased when compared with the positive control group (group E). It demonstrated that both drugs used in the treatment of *T. gondii* can modulate the inflammatory response, as described above. These IL-10 results can be easily explained, since ST and resveratrol were already reported as promoting suppressive [22] and anti-inflammatory [12,28] actions. Thus, these compounds when used in our experimental design were able to modulate the cytokine release, a situation that can be interpreted as a protective effect on the host.

After the treatment with free resveratrol and inclusion complex containing resveratrol associated with ST, the histology results indicated a reduction on the inflammatory infiltrate, which may suggest an anti-proliferative effect of these combinations, since ST reduced levels of pro-inflammatory cytokines in uninfected animals. Among all groups of animals infected and treated, those who received the combination ST and nanocapsules containing resveratrol had the most marked anti-inflammatory response, which may be a result of a slower release of resveratrol due to the nanotechnology process [13]. Considering that the half-life of this drug is short in the digestive tract, due easily destroyed by acids and enzymes [29], the inclusion complex technology is one of the benefits of this technology, allowing a better absorption and controlled release [13].

In summary, it is known that the ST and resveratrol, when used in treatments, can interfere with cytokine release. The combination of these drugs in the treatment of toxoplasmosis is unknown, as well as their effects on inflammation process. Based on the results, we can conclude that both drugs interfere with the assessment of cytokine in serum

samples. The drug combination modulated the immune response, as well as reduced the inflammation on liver samples of animals infected by *T. gondii*. Another mechanism with beneficial effects was the use of resveratrol- HP β CD complex in association with ST, since these association led to a lower level of pro-inflammatory cytokines in serum, along with milder and small focus of inflammatory infiltrates, on liver samples. Summing up, we can suggest that the combination of these drugs in the treatment of toxoplasmosis may have a protective effect due its immunomodulatory action. Future studies are on development, in order to clarify the mechanisms involved in these alterations.

Commission of ethics and animal welfare

This research project was approved by Ethics Committee on Animal Experiments of Universidade do Estado de Santa Catarina, under protocol number 01.52.13.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Dubey JP. Toxoplasmosis of Animals and Humans, second ed, CRC Press, Boca Raton, 2012.
- [2] Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000; 64: 607–623.
- [3] Frenkel KK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Sci. 1970; 167: 893–6.
- [4] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 2000; 30: 1217–1258.

- [5] De Souza W, Duarte ESM, Urbina JA, Vommaro RC. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. J. Antimicrob. Chemot. 2006; 58: 59–65.
- [6] Lopes FMR, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Br. J. Infec. Dis. 2007; 11: 1-5.
- [7] Nóbrega JPS. Treatment of toxoplasmosis of the central nervous system with the combination sulfamethoxazole-trimethoprim: report of 10 cases. Arch. Neuro-Psiquiatry 1991; 49: 1-4.
- [8] Frémon L. Biological effects of resveratrol. Life Sciences 2000; 66: 663–673.
- [9] Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 2002; 282: 1996-2003.
- [10] De la Lastra C, Villegas A. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. Biochem. Soc. Transact. 2007; 35: 1156–1160.
- [11] Olas B, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. D-glucaro 1,4-lactone and resveratrol as antioxidants in blood platelets. Cel. Biol. Toxicol. 2008; 24: 189-199.
- [12] Serra D, Rufino AT, Mendes AF, Almeida LM, Dinis TCP. Resveratrol modulates cytokine-induced JAK/STAT activation more efficiently than 5-minosalicylic acid: An in vitro approach. Plos One 2014; 9: 109048.
- [13] Musyanovych A, Landfester K. Polymer Micro- and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties. Macromol. Biosc. 2014; 14: 458-477.
- [14] Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 2009; 39: 23-39.
- [15] Barbosa C, Tonin AA, Da Silva AS, De Rue M. Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on

- oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation. *Parasitology*. Parasitol. 2014; 141: 1761-1768.
- [16] Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kühl AA, Loddenkemper C, Göbel UB, Heimesaat MM. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLOS One* 2010; 5: 15099.
- [17] Kamiyama T, Hagiwara T. Augmented followed by suppressed levels of natural cell-mediated cytotoxicity in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 1982; 36: 628–636.
- [18] Bohne W, Heesemann J, Gross U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in c interferon-treated mouse macrophages. *Infect. Immun.* 1993; 61: 1141–5.
- [19] Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Immunol.* 2005; 5: 162–170.
- [20] Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, Abo T, Sher A, Remington JS, Suzuki Y. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Paras. Immun.* 1999; 21: 365–376.
- [21] Evans TG, Schwartzman JD. Pulmonary toxoplasmosis. *Seminars in Respiratory Infections* 1991; 6: 51-57.
- [22] Mckae D, Buchanan G. Long-term sulfamethoxazole-trimethoprim in Wegener's granulomatosis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1993; 119: 103-5.
- [23] Hébraud B, Kamar N, Borde JS, Bessièrès MH, Galinier M, Rostaing L. Unusual presentation of primary toxoplasmosis infection in a kidney-transplant patient complicated by an acute left-ventricular failure. *NDT Plus* 2008; 1: 429-432.

- [24] Ohtake T, Kobayashi S, Honjou Y, Shirai T, Takayanagi S, Tohyama K, Tokura Y, Kimura M. Generalized Wegener's granulomatosis responding to sulfamethoxazole-trimethoprim monotherapy. *Intern. Med.* 2001; 40: 666-70.
- [25] Anderson R, Grabow G, Oosthuizen R, Theron A, Van Rensburg AJ. Effects of sulfamethoxazole and trimethoprim on human neutrophil and lymphocyte functions in vitro: *in vivo* effects of co-trimoxazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 17: 322-326.
- [26] Yang Y, Li S, Yang Q, Shi Y, Zheng M, Liu Y, Chen F, Song G, Xu H, Wan T, Chen J. Resveratrol reduces the proinflammatory effects and lipopolysaccharide-induced expression of HMGB1 and TLR4 in RAW264.7 cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2014; 28: 1283-1292.
- [27] Arababadi MK, Mosavi R, Khorramdelazad H, Yaghini N, Zarandi ER, Araste M, Pourali R, Nekhei Z, Kennedy D. Cytokine patterns after therapy with Avonex®, Rebif®, Betaferon® and CinnoVex® in relapsing-remitting multiple sclerosis in Iranian patients. *Biomark. Medicine* 2010; 4: 755–9.
- [28] Bellaver B, Souza DG, Souza DO, Quincozes-Santos A. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicol. in Vitro* 2014; 28: 479-484.
- [29] Watal G, Watal A, Rai PQ, Rai DQ, Sharma G, Sharma B. Biomedical applications of nano-antioxidant. *Meth. Mol. Biol.* 2013; 1028: 147-151.

Table 1: Pro and anti-inflammatory cytokines in the serum of animals experimentally infected with *T. gondii*, treated with sulfamethoxazole-trimethoprim and resveratrol in its free and inclusion complex forms.

Groups	IL -1 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	INF- γ (μ g/mL)	IL-10 (pg/mL)
A	41.5 ^d (\pm 4.8)	63.3 ^d (\pm 4.6)	72.8 ^{de} (\pm 3.9)	85.0 ^f (\pm 5.4)	104.6 ^{de} (\pm 7.9)	154.2 ^b (\pm 8.5)
B	32.4 ^e (\pm 3.4)	43.8 ^f (\pm 4.5)	51.4 ^f (\pm 6.1)	64.4 ^g (\pm 5.5)	94.8 ^f (\pm 11.7)	157.8 ^b (\pm 9.1)
C	43.0 ^d (\pm 2.7)	58.2 ^{de} (\pm 6.92)	68.0 ^e (\pm 4.0)	107.2 ^e (\pm 3.4)	126.8 ^c (\pm 3.7)	169.6 ^a (\pm 6.1)
D	39.2 ^d (\pm 3.2)	55.6 ^c (\pm 4.1)	69.4 ^e (\pm 2.4)	92.8 ^f (\pm 6.7)	111.2 ^d (\pm 3.2)	161.0 ^a (\pm 2.1)
E	101.3 ^a (\pm 3.9)	127.7 ^a (\pm 5.6)	142.2 ^a (\pm 12.9)	174.2 ^a (\pm 9.3)	171.7 ^a (\pm 11.1)	77.5 ^d (\pm 5.2)
F	63.7 ^c (\pm 8.7)	75.5 ^c (\pm 2.0)	116.5 ^b (\pm 10.9)	132.2 ^c (\pm 3.3)	98.0 ^e (2.1)	134.2 ^c (\pm 6.9)
G	80.3 ^b (\pm 1.5)	93.3 ^b (\pm 3.1)	118.4 ^b (\pm 3.6)	144.6 ^b (\pm 4.0)	149.2 ^b (\pm 2.5)	132.8 ^c (\pm 4.3)
H	61.2 ^c (\pm 12.5)	73.3 ^c (\pm 7.2)	98.1 ^c (\pm 19.3)	132.2 ^{bc} (\pm 18.5)	104.0 ^{def} (\pm 14.4)	134.0 ^c (\pm 6.2)
I	71.0 ^{bc} (\pm 12.8)	91.5 ^b (\pm 15.8)	110.7 ^{bc} (\pm 17.2)	139.7 ^{bc} (\pm 8.7)	126.5 ^c (\pm 5.2)	133.4 ^c (\pm 3.9)
J	41.2 ^d (\pm 2.7)	62.5 ^d (\pm 8.1)	79.5 ^d (\pm 9.2)	123.3 ^d (\pm 4.6)	80.5 ^g (\pm 6.0)	134.6 ^c (\pm 7.1)

* Means \pm SD followed by the same letter in the same row do not differ significantly by the Duncan test (P>0.05). Groups A-D (uninfected) and Groups E-J (infected). Groups: A (untreated and uninfected); B (uninfected and treated with sulfamethoxazole-trimethoprim (ST)); C (uninfected and treated with free resveratrol (FR)); D (uninfected and treated with inclusion complex of resveratrol (ICR)); E (infected and untreated); F (infected and treated with ST); G (infected and treated with FR); H (infected and treated with ICR); I (infected and treated with ST and FR); and J (infected and treated with ST and ICR).

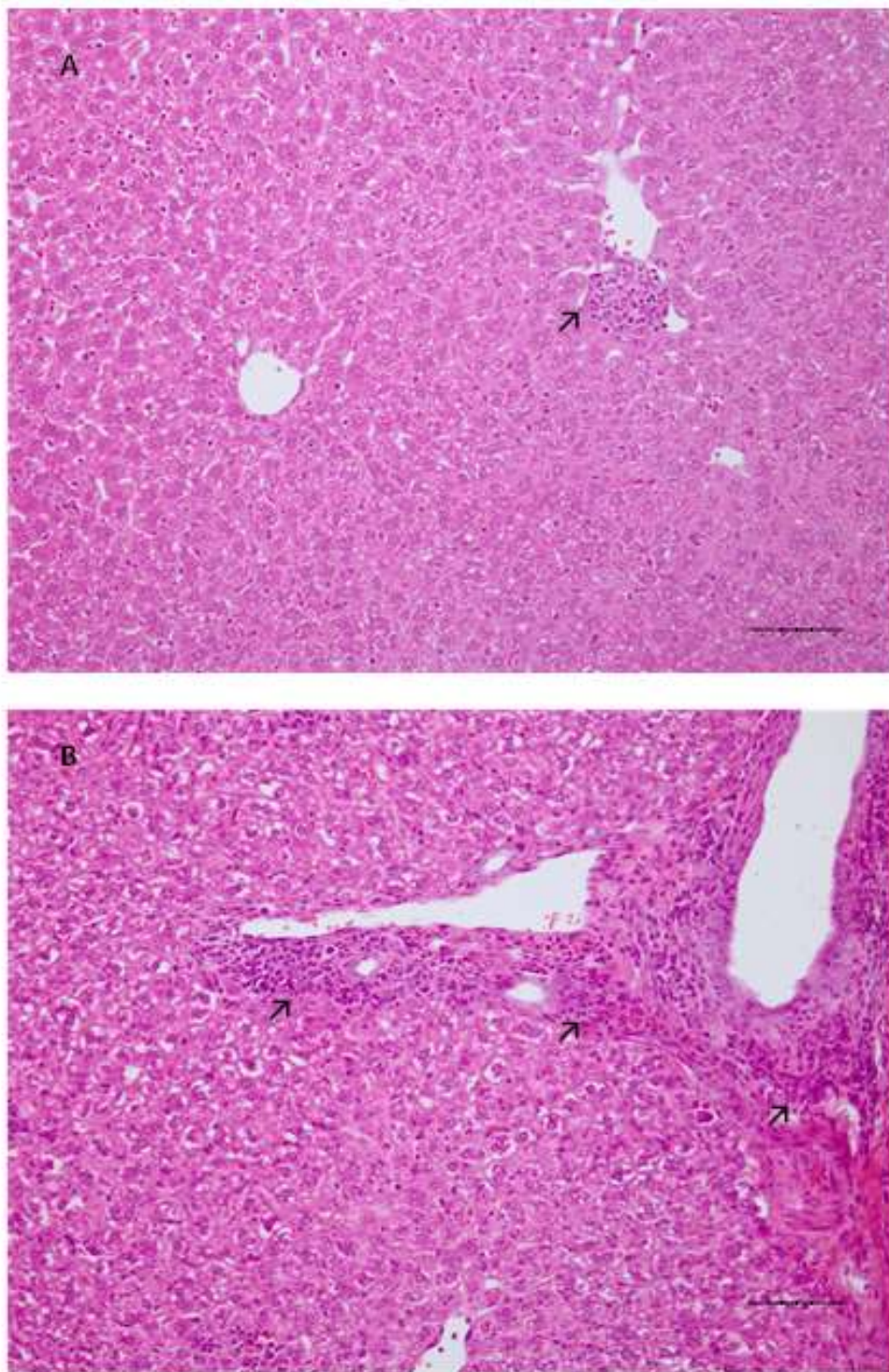


Figure 1. Liver histology of mice infected by *Toxoplasma gondii*. Liver of mice treated with the combination of drugs (Group I - ST and resveratrol) showed less and smaller areas with foci of inflammatory infiltrates (A) compared to infected and untreated mice (B: group E). BAR: 100 μ m.

4. DISCUSSÃO

O *T. gondii* é um dos protozoários de maior sucesso biológico já reconhecidos (SULLIVAN JR e JEFFERS, 2012), pois apesar de ser um parasita intracelular obrigatório, este protozoário tem notável transmissibilidade e permanentemente infecta diversos tipos de células. Como já bem elucidado, a habilidade do *T. gondii* de se encistar dentro das células e se reverter no estágio proliferativo propiciou para a reprodução sexuada e transmissão deste parasita nas células hospedeiras. Em termos de saúde humana e veterinária, entender os mecanismos de transmissão, infecção e resposta imunológica são fatores chave para minimizar as formas de transmissão da toxoplasmose, os efeitos colaterais da quimioterapia e contribuir com alternativas na terapia da toxoplasmose. Neste estudo, objetivamos verificar os benefícios do resveratrol, um potente antioxidante naturalmente encontrado em uvas, associado à quimioterapia convencional no tratamento da toxoplasmose a base de sulfadiazina-trimetropim (ST) sobre parâmetros comportamentais, contagem de cistos cerebrais, alterações histopatológicas, perfil oxidativo/antioxidante e níveis de citocinas em camundongos experimentalmente infectados com cepa VEG de *T. gondii*.

Cepas da linhagem tipo II 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 ocorre em humanos prolongando a sobrevivência dos animais em estudo e confirmando a patologia através dos sinais clínicos encontrados (HOWE et al., 1997). A predileção dos bradizoítos de *T. gondii* em ocorre principalmente no SNC (DUBEY, 1998), assim como verificamos nesse estudo, pois os animais infectados e não tratados apresentaram grande quantidade de cistos cerebrais.

Sabendo que a toxoplasmose latente é capaz de ocasionar mudanças emocionais, de personalidade e alterações nos níveis de inteligência (FLEGR et al., 2003), a infecção por *T. gondii* em camundongos representa um modelo chave para o estudo comportamental. Estudos sugerem que o *T. gondii* altera o comportamento de roedores, aumentando a chance de serem predados por felinos (WEBSTER et al., 1993; QUEIROZ et al., 2013). Tal constatação é compatível com os resultados encontrados neste estudo, onde os animais infectados com *T. gondii* exploraram mais vezes os braços abertos no teste de cruz elevada demonstrando um efeito ansiolítico à medida que a doença evoluiu (31 dias após infecção).

Ao administrar resveratrol livre e na forma de complexo de inclusão em associação com ST os animais não apresentaram atividade ansiolítica, pois ocorreu uma redução no tempo de

permanência e número de entradas nos braços abertos em concordância com os resultados demonstrados por Gonzalez et al. (2007). A ausência de resultados estatisticamente significativos encontrados pelo modelo de *Open Field* excluem o efeito ansiolítico por repressão ou indução locomotora dos animais em estudo.

A memória também foi avaliada nos animais e os resultados demonstraram uma redução significativa da memória a longo prazo nos animais infectados por *T. gondii*. O efeito observado pode estar associado à área cerebral encistada conforme já demonstrado por Di Cristina et al. (2008). Quando a associação de resveratrol nas formas livre e em complexo de inclusão com ST foi administrada, não houve alteração de memória nesses animais. O complexo de inclusão parece responder melhor, já que essa formulação libera a droga de forma lenta, contínua e em regiões cerebrais específicas, diferentemente da forma livre que rapidamente é metabolizada no tecido hepático (FROZZA et al., 2013). A ST, o resveratrol livre e o complexo de inclusão, não apresentaram efeitos de forma isolada, assim como não foram capazes de reduzir o número de cistos cerebrais, levando a creer que a associação é a melhor opção terapêutica.

Tendo em vista que a conversão de bradizoítos em taquizoítos de *T. gondii* é mediada pela liberação de espécies reativas ao oxigênio como o óxido nítrico (BOHNE et al., 1993), este estudo suporta a idéia de que o aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e a redução da citocina anti-inflamatória (IL-4, IL-10) em animais infectados com *T. gondii* contribuíram para a inflamação e conseqüentemente para o estresse oxidativo e as lesões histopatológicas encontradas em nosso estudo e já reportadas por Liesenfeld et al. (1999); HUNTER e SIBLEY (2012). Os resultados histopatológicos em fígado indicaram focos de necrose e grande infiltrado inflamatório composto de linfócitos e macrófagos em animais infectados por *T. gondii*, provavelmente em resposta à proliferação de taquizoítos e a intensa reação de células mononucleares (EVANS e SCHWARTZMAN, 1991). Essas lesões foram menores quando o tratamento associado de ST e resveratrol foi administrado.

A indução de uma resposta imunológica com produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foram responsáveis pelo controle da infecção (KAMIYAMA e HAGIWARA, 1982). Os resultados revelaram ainda, que a ST isolada apresentou um efeito anti-inflamatório. A associação do complexo de inclusão com resveratrol a ST reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias em animais infectados, sendo capaz de manter a níveis similares ao controle (animais saudáveis).

Os tratamentos com resveratrol na forma livre e em complexo de inclusão associado a ST, reduziram o infiltrado inflamatório conforme já mencionado, podendo sugerir um efeito anti-

proliferativo da associação, uma vez que a ST reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias em animais não infectados. A associação, ainda, foi capaz de reduzir o número de cistos cerebrais em animais infectados com *T. gondii*. Estudos anteriores envolvendo a associação da sulfadiazina e pirimetamina como realizados por Martins-Duarte et al. (2013), demonstram um efeito terapêutico potencializado e aumento da longevidade de animais infectados que receberam tratamento em combinação com a sulfadiazina.

Considerando as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do resveratrol, bem como os efeitos benéficos na prevenção e tratamento de inúmeras complicações cerebrais, utilizamos neste estudo o resveratrol nas formas livre e em complexos de inclusão. Neste estudo, pôde-se verificar que doses baixas de resveratrol (100 mg kg^{-1}) foram capazes de modular o perfil oxidativo e aumentar o *status* antioxidante em camundongos infectados com *T. gondii*. Os resultados demonstraram que a ST e o resveratrol livre, assim como na associação reduziram os níveis de AOPP em fígado. Este resultado pode ser explicado pelo sistema enzimático do citocromo P450 (CYP), o qual é responsável pelo metabolismo oxidativo de centenas de drogas (COOPER et al., 1965; GUENGERICH, 2008) dentre elas a isoforma C9 da sulfadiazina. A baixa expressão de CYP pela ação da ST sobre o citocromo P450 está associada diminuição da viabilidade celular, resultado em necrose e apoptose celular (WU e CEDERBAUM, 2001; BUTURA et al., 2009) que continuaram presentes, porém em menor grau na histopatologia de fígado.

Além disso, no fígado o resveratrol na forma livre, associado a ST e na forma de complexo de inclusão, diminuiu os níveis de AOPP. Isso pode ser explicado pela propriedade antioxidante do resveratrol, o qual é metabolizado nas células hepáticas e contribui para a indução de apoptose em animais infectados por *T. gondii* com consequente formação de produtos protéicos (LANAGERMANS et al., 1999). Em contrapartida, o complexo de inclusão em associação a ST diminuiu os valores de AOPP, como já demonstrado por estudo realizado por Csiszár et al. (2014).

O resveratrol é capaz de prevenir danos relacionados ao estresse oxidativo em condições fisiopatológicas, principalmente quando nanoencapsulado devido sua ação antioxidante bem estabelecida. Nas associações de resveratrol livre e em complexo de inclusão com ST, o aumento nos níveis de AOPP e TOS em cérebro pode estar relacionado a própria proteína resultante da fagocitose do parasito pelos macrófagos, já que nas associações o tratamento foi mais eficaz reduzindo o número de cistos. Os níveis aumentados de TOS em deve-se ao processo de remodelamento celular que o *T. gondii* realiza ao absorver os nutrientes

necessários para o crescimento do parasito, reduzindo dessa forma a disponibilidade de aminoácidos em tecido cerebral (GASKELL et al., 2009).

Os níveis de TAC em fígado e FRAP em cérebro aumentaram em camundongos infectados com *T. gondii*, o que pode ser uma consequência do aumento dos níveis oxidantes no presente estudo. Outra explicação, segundo Kwok et al. (2014) é que o parasito possui um sistema antioxidante intrínseco através da expressão da enzima catalase, similarmente ativada pelo hospedeiro durante a resposta oxidativa, o que pode explicar os níveis antioxidantes aumentados em animais infectados. O resveratrol livre e em complexo de inclusão combinado com a ST também foi capaz de proteger essas estruturas, sendo um provável efeito antioxidante do resveratrol, o qual protege o organismo do hospedeiro contra as espécies reativas produzidas pelo *T. gondii*, como demonstrado nos resultados oxidantes.

Portanto, este estudo demonstrou os efeitos do resveratrol associado à quimioterapia a base de ST sobre redução no número de cistos cerebrais, na modulação de alterações comportamentais relacionados à memória e à ansiedade. O tratamento influenciou no *status* oxidativo/antioxidante, aumentando os níveis de antioxidantes, como um efeito protetor ao animal infectado. Além disso, a ST combinada ao resveratrol causou uma redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias quando comparado aos animais infectados e não tratados o que pode ser interpretado como ação protetora, já que o processo inflamatório durante a infecção pelo parasito pode contribuir para o aumento dos danos teciduais. De modo geral, podemos concluir que o protocolo terapêutico sugerido apresenta vantagens no tratamento da toxoplasmose, sendo o complexo de inclusão de resveratrol em associação a ST a melhor opção terapêutica.

5. CONCLUSÕES

- 1) Os animais infectados com *T. gondii* desenvolvem alterações comportamentais, como ansiedade e perda de memória. Os tratamentos de forma isolados com sulfametoxazol-trimetropim, resveratrol livre e nanocapsulas de resveratrol não foram capazes de reverter as alterações de comportamento, porém a combinação da sulfametoxazol-trimetropim e resveratrol livre demonstrou efeito protetor do resveratrol, com ausência da alteração comportamental conhecida como ansiedade.
- 2) Animais infectados com *T. gondii* estão sujeitos a estresse oxidativo com aumento nos níveis de AOPP e TOS mais acentuado em células hepáticas do que tecido cerebral. O sulfametoxazol-trimetropim e o resveratrol livre foram capazes de reduzir os níveis de AOPP em fígado em animais não infectados, demonstrando que o sulfametoxazol-trimetropim, bem como resveratrol livre agem como potentes antioxidantes em fígado.
- 3) O sulfametoxazol-trimetropim em combinação com o resveratrol na forma de complexo de inclusão provou ser a formulação terapêutica mais efetiva na redução do número de cistos parasitários no cérebro de camundongos infectados com *T. gondii*. Animais com a combinação de resveratrol livre associado a sulfametoxazol-trimetropim, foi capaz de reduzir o número de cistos cerebrais quando comparado ao controle positivo, revelando que o resveratrol atua diminuindo o número de cistos cerebrais, porém por mecanismos ainda desconhecidos.
- 4) Focos de necrose e infiltrado inflamatório consistente em animais infectados com *T. gondii* ocorrem em fígado, porém a terapia de sulfametoxazol-trimetropim isolada e em associações com resveratrol livre e em forma de complexos de inclusão parecem proteger o órgão, pois raros e pequenos infiltrado inflamatório são observados, reiterando a ação anti-inflamatória desses compostos.
- 5) Animais infectados com *T. gondii* apresentaram um aumento nas citocinas pró-inflamatórias e redução na citocina anti-inflamatória, como resposta ao controle da

replicação do parasito. O aumento das citocinas pró-inflamatórias contribuiu para a inflamação tecidual revelada pela análise histológica. O sulfametoxazol-trimetropim revelou ter efeito anti-inflamatório por reduzir as citocinas pró-inflamatórias quando isolado. O resveratrol livre e o complexo de inclusão em associação ao sulfametoxazol-trimetropim diminuíram os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentaram a citocina anti-inflamatória, IL-10 em animais infectados com *T. gondii*, demonstrando interferir sinergicamente na resposta imune do hospedeiro contra o parasito.

REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. et al. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 5, p. 485-490, 2003.
- ALIBERTI, J. Host persistence: Exploitation of anti-inflammatory pathways by *T.gondii*. **Nature Reviews Immunology**. v.5, p.162–170, 2005.
- AMATO NETO, V. et al. **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995, p.154.
- AMRI, A. et al. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v. 158, p. 182–193, 2012.
- ANDLAUER, W. et al. Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rats. **Drugs Experimental Clinical Research Journal**, v.26, n.2, p. 47–55, 2000.
- ANEKONDA, T.S. Resveratrol-A boon for treating Alzheimer’s disease? **Brain Research Reviews**, v.52, n.2, p.316-326, 2006.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiology**, v.11, n.9, p. 426-30, 2003.
- 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. et al. 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, e28925, 2011.
- BERTELLI, A.A. et al. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after shortterm or prolonged administration of red wines to rats. **International Journal of Tissue Reactions**, v.18, n.3, p. 67–71, 1996.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3. p. 607–623, 2000.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in c interferon-treated mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 61, n.3, p. 1141–1145, 1993
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.
- BUTURA, A. et al. The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model. **Journal of Hepatology**, v.50, n.1, p. 572-583, 2009.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropical**, v. 81, n. 2, p. 111-122, 2002.

COOPER, D.Y. et al. Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. **Science**, v.147, n.3656, p.400-402, 1965.

COX, D.M.; HOLLAND, C.V. Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. **Journal of Helminthology**, v.75, p.33-41, 2001.

CSISZÁR, A. et al. Resveratrol encapsulated in novel fusogenic liposomes activates nrf2 and attenuates oxidative stress in cerebromicrovascular endothelial cells from aged rats. **The Journal of Gerontology A Biological Sciences and Medical Sciences**, v.18, n.1, 2014.

DARDÉ, M. L.; AJZENBERG, D. Le polymorphisme du toxoplasme et ses conséquences cliniques. **Archives de Pédiatrie**, v. 10, p. 45-46, 2012.

DI CRISTINA, M. et al. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into Bradyzoites and tissue cyst formation in vivo. **Infection and Immunity**, v. 76, n.8, p.3491–3501, 2008.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals, p. 101-237. In J. P. Kreier (ed.), **Parasitic protozoa**. ed. 3rd. Academic Press, Inc., New York, N.Y, 1977.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In J. P. Kreier (ed.), **Parasitic protozoa**. ed. 6. Academic Press, Inc., New York, N.Y, 1993, p.1-158.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, 2002.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60-73, 2010.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. **Boca Raton**, v. 2, p. 313, 2012

ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further healthy promotion action. **Public Health**, v. 122, n.4, p. 335–353, 2008.

ELSHEIKHA, H. M. et al. Oxidative stress and immune-suppression in *Toxoplasma gondii* positive blood donors: implications for safe blood transfusion. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 39, n.2, p. 421– 428, 2009.

EVANS, T. G.; SCHWARTZMAN, J.D. Pulmonary toxoplasmosis. **Seminários em doenças Respiratórias e Infecciosas**, v. 6, p. 51-57, 1991.

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.

FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W.M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. **Virchows Archives**, v. 411, n. 1, p. 39-43, 1987a.

FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitology Research**, v. 73, n. 6, p. 483-491, 1987b.

FERREIRA, A. M. et al. 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.

FLEGR, J. et al. Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* Dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis? **Biological Psychology**, v. 63, p. 253–268. 2003.

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

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: **The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera**. University Park Press. 1973, p. 343-410.

FRENKEL, J. K.; NELSON, B.M.; ARIAS-STELLA, J. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis. Clinical and experimental aspects. **Human Pathology**, v.6, n.1, p.97–111, 1975.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v. 4, n.10 p. 273–278, 1998.

FREYRE, A. et al. *Toxoplasma gondii*: Partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. **Experimental Parasitology**, v.112, p. 8-12, 2006.

FROZZA, R. L. et al. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.9, n.12, p. 2086-2104, 2013.

- GAO, Z. B.; CHEN, X. Q.; HU, G.Y. Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. **Brain Research**, v.1111, n.1, p. 41-47, 2006.
- GASKELL, E. A. et al. A Unique Dual Activity Amino Acid Hydroxylase in *Toxoplasma gondii*. **Plos one**, v.4, n. 3, e4801, 2009.
- GATKOWSKA, J. et al. Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 53-58, 2012.
- GAZZINELLI, R.T. et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **The Journal of Immunology**, v.157, n.2, p. 798-805, 1996.
- GESCHER, A.; STEWARD, W.P.; BROWN, K. Resveratrol in the management of human cancer: how strong is the clinical evidence? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1290, p.12–20, 2013.
- GLASNER, P.D. et al. An Unusually High Prevalence of Ocular Toxoplasmosis in Southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v.114, n.2, p. 136-144, 1992.
- GONZALEZ, L.E. et al. *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats: A behavioral analysis. **Behavioural Brain Research**, v.177, n.1, p.70-79, 2007.
- GROER, M. et al. Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii* positive women. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v.204, n.5, p. 433-437, 2011.
- GRUJIC, J. et al. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, n.3, p. 226-230, 2005.
- GUENGERICH, F.P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v.21, n.1, p. 70-83, 2008.
- GUERINA, N.G. et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1858–63, 1994.
- HARKER, K. et al. Shear forces enhance *Toxoplasma gondii* tachyzoite motility in vascular endothelium. **mBio**, v.5, n.2, p.: 1111-1113, 2014.
- HEGAB, S.M.; AL-MUTAWA, S.A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v.3, n.2, p. 84-105, 2003.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology Infection**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.
- HOU, B. et al. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy 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.
- HOWE, D.K. et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.6, p. 1411–1414, 1997.
- HOWITZ, K.T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v.425, n.6954, p. 191–196, 2003.
- HSU, P.C.; GROER, M.; BECKIE, T. New findings: Depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v.26, p. 629-637, 2014.
- HUANG, T.C. et al. Resveratrol Protects Rats from A β -induced Neurotoxicity by the Reduction of iNOS Expression and Lipid Peroxidation. **Plos one**, v.6, n.12, e29102, 2011.
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2012.
- JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v.275, n.5297, p. 218–220, 1997.
- JANNIN, B. et al. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. **Biochemical Pharmacology**, v.68, n.6, p. 1113-1118, 2004.
- JONES, J. L. et al. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305. 2001.
- KATZUNG, B.C. **Farmacologia Básica e clínica**. ed 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 546-554, 2006.
- KAMIYAMA, T.; HAGIWARA, T. Augmented followed by suppressed levels of natural cell-mediated cytotoxicity in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 36, n.2, p. 628–636, 1982.
- KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. ed.10. São Paulo: Atheneu. 149-156, 2002.
- KELLY, M.N. et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.
- KHAN, A. et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645-655, 2011.

KING, R.E.; KENT, K.D.; BOMSER, J.A. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. **Chemico Biological Interactions**, v. 151, n.2, p.143–149, 2005.

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.

KIM, Y.A. et al. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in betaamyloid- treated C6 glioma cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v.17, n.6, p. 1069–1075, 2006.

KLINGE, C.M. et al. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor α -Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v.22, p.2185-2197, 2008.

KWOK, L.Y. et al. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 47–61, 2014.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. **Physiology and Plant Pathology**, v. 9, p. 77–86, 1976.

LANGERMANS, J.A. et al. IFN-gamma induced l-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Immunology**, v. 148, n.2, p. 568–574,1999.

LANGERMANS, J.A. et al. IFN-gamma induced l-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**, v. 148, n.2, p.568–574, 1992.

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.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the Sporozoa. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 208-209, 1970.

LIESENFELD, O.; KANG, H.; PARK, D.TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 7, p. 365-376, 1999.

LOPES, F.M.R. et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **Brazilian Journal of Infection Diseases**, v.11, n.5, 2007.

- LÓPEZ-NICOLÁS, J.M. et al. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1135, n.2, p. 158–165, 2006.
- LU, X. et al. Resveratrol-loaded polymeric micelles protect cells from A β -induced oxidative stress. **International Journal of Pharmaceutics**, v.375, n.1, p. 89–96, 2009.
- MARTINS-DUARTE, E.S.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R.C. *Toxoplasma gondii*: the effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. **Experimental Parasitology**, v.133, n.3, p.294-299, 2013.
- MENZIES, F.M.; HENRIQUEZ, F.L.; ROBERTS, C.W. Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model. **Immunology Letters**, v.115, p.83-89, 2008.
- MILLER, C.M. et al. The immunobiology of the innate response to *T.gondii*. **Internacional Journal for Parasitology**, v.39, n.1, p.23–39, 2009.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MOKINI, M. et al. Effect os resveratrol on antioxidante enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemical Research**, v.32, n.6, p. 981-987, 2007.
- MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K. Polymer Micro- and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties. **Macromolecular Bioscience**, v.14, n.4, p.458-477, 2014.
- NAM, J.B. et al. Stabilization of resveratrol immobilized in monodisperse cyano-functionalized porous polymeric microspheres. **Polymer**, v. 46, n.21, p. 8956–8963, 2005.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences**. v. 147, p. 763-766, 1908.
- 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.
- NÓBREGA, J.P. Treatment of toxoplasmosis of the central nervous system with the combination sulfamethoxazole-trimethoprim: report of 10 cases. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.49, n.3, 1991.
- 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.
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars Fetal Neonatal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 214-223, 2007.
- PETERSEN, E.; KIJISTRA, A.; STANFOED, M. Epidemiology of ocular toxoplasmosis. **Ocular Immunology and Inflammatory**, v.20, n.2, p. 68-75, 2012.

PFEFFERKORN, E.R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, n.3, p. 908–912, 1984.

PLATTNER, F. et al. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host and Microbe**, v.3, n.2, p. 77–87, 2008.

POCHE, F. Das System der Protozoa. **Archives in Protistenk**, v. 30, p. 125-321, 1913.

QUEIROZ, M.L. et al. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* coinfecting by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.55, n.1, p. 51-53, 2013.

REMINGTON, J.S.; CAVANAUGH, E.M. Isolation of the encysted form of *T. gondii* from human skeletal muscles and brain. **The New England Journal of Medicine**, v. 273, p. 1308-1310, 1965.

REMINGTON, 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; 2001. p. 205–346.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROOS, D. S. et al. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Methods in Cell Biology**, v. 45, p. 27-63. 1994.

SAIKO, P. et al. Resveratrol and its analogs: Defense against câncer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research Review** v.658, n.2, p.68-94, 2008.

SALE, S. et al. 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.

SCANGA, C. A. et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 168, n.12, p. 5997–6001, 2002.

SCHMATZ, R. et al. 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.

SHER, A. et al. Induction and regulation of IL-12- dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunology Research**, v. 27, n. 2-3, p. 521-528, 2003.

SHI, G. et al. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **International Journal of Pharmaceutics**, v.349, n.2, p.83–93, 2008.

SILVA, N.M. et al. *Toxoplasma gondii*: The severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood–brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 167-177, 2010.

SILVA-SEGUNDO, G.R.S. **Incidência de toxoplasmose congênita em hospitais públicos e privado**. 2002. Dissertação (Dissertação de Mestrado Instituto de ciências Biomédicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2002.

SINHA, K.; CHAUDHARY, G.; GUPTA, Y. K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Science**, v. 71, n.6. p. 655–665, 2002.

SLOWING, K.V. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v.275, n.5297, p. 218–220, 1997.

SOLEIMANI, L.; LAPIDUS, K.; IOSIFESCU, D.V. Diagnosis and treatment of major depressive disorder. **Neurological Clinics**, v. 29, p. 177–193, 2011.

SPALDING, S.M. et al 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.

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.

SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to Molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2010.

SULLIVAN JR, W.J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **Microbiology Reviews**, v.36, n.3, p.717-733, 2012.

TAKAOKA, M.J. Of the phenolic substances of White hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). **Journal o the Faculty of Sciences, Hokkaido Imperial University**, v.3, n.1, p. 1–16, 1940.

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.

TONIN, A.A. et al. Influence of toxoplasmosis on acetylcholinesterase activity, nitric oxide levels and cellular lesion on the brain of mice. **Pathology – Research and Practice**, v. 210, p.526–532, 2014a.

TONIN, A.A. et al. 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, 2014b.

TORREY, E.F.; BARTKO, J.J.; YOLKEN, R.H. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. **Schizophrenia Bulletin**, v.38, n.3, p 642-647, 2012

TOXOPLASMA GONDII JPEG. Altura: 1467.Largura 1120. Formato JPEG in: <http://pixshark.com/toxoplasma-gondii-morphology.htm>. Acesso em 03 de janeiro de 2015.

VALENZANO, D.R. et al. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a shortlived vertebrate. **Current Biology**, v.16, n.3, p. 296–300, 2006.

VASTANO, B.C. et al. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.2, p. 253–256, 2000.

YAROVINSKY, F. et al. 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.

WATAL, G. et al. Biomedical applications of nano-antioxidant. **Oxidative Stress and Nanotechnology Methods in Molecular Biology**, v. 1028, p. 147-151, 2013.

WALLE, T. et al. 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, Y. et al. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.3, p. 431–435, 2002.

WEBSTER, J.P.; BRUNTON, C.F.A.; MACDONALD, D.W. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behavior in wild brown rats, *rattus norvegicus*. **Parasitology**, v.109, n.1, p.37–43, 1993.

WEISS, L. M.; KIM, K. *Toxoplasma gondii*. **The model Apicomplexan: Perspectives and Methods**. ed. Elsevier, Burlington (US), 2007, p.801.

WENZEL, E.; SOMOZA, S. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n.5, p. 472–481, 2005.

WHO. **Model Prescribing Information: Drugs Used in HIV-Related Infections**, 1999. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

WU, D.; CEDERBAUM, A.I. Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 25, n.4, p. 619-628, 2001.

ANEXOS



CARTA DE APROVAÇÃO

O(s) projeto(s) abaixo relacionado(s):

Protocolo: 01.52.13

Título: Efeitos do resveratrol na forma convencional e em nanopartículas associado aos fármacos quimioterápicos tradicionais no tratamento da tripanossomose e toxoplasmose

Coordenador/Pesquisador: Aleksandro Schafer da Silva

Foi(ram) analisado(s) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UDESC (CETEA/UDESC) tendo sido **APROVADO(S)** em seus aspectos éticos e metodológicos, para utilização de animais em pesquisa, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa no Brasil.

Lages, 10 de junho de 2014.

Prof. Ubirajara Maciel da Costa
Coordenador do CETEA/UDESC