

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

Bianca Fagan Bissacotti

**EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE CÉLULAS NEURAIS,
DIFERENCIAÇÃO NEURAL E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS COM TOXOPLASMOSE**

Santa Maria, RS
2022

Bianca Fagan Bissacotti

**EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE CÉLULAS NEURAIS, DIFERENCIAÇÃO
NEURAL E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS
COM TOXOPLASMOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Maria Melchior Morsch

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Nathieli Bianchin Bottari

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Bissacotti, Bianca Fagan

Efeitos da curcumina sobre células neurais, diferenciação neural e sinalização purinérgica em embriões de camundongos com toxoplasmose / Bianca Fagan Bissacotti.- 2022.

121 p.; 30 cm

Orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Coorientadores: Vera Maria Melchiors Morsch, Nathieli Bianchin Bottari

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2022

1. Células precursoras neurais 2. Curcumina 3. Neurogênese 4. Sistema purinérgico 5. Toxoplasma gondii
I. da Silva, Aleksandro Schafer II. Morsch, Vera Maria Melchiors III. Bottari, Nathieli Bianchin IV. Título.

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

Declaro, BIANCA FAGAN BISSACOTTI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Bianca Fagan Bissacotti

EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE CÉLULAS NEURAIS, DIFERENCIAÇÃO NEURAL E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS COM TOXOPLASMOSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

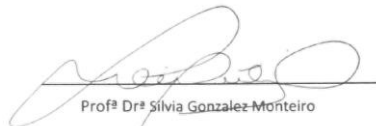
Aprovado em 26 de janeiro de 2022:



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



Alexander Henning Ulrich, Dr. (USP) - Videoconferência
(Membro efetivo da banca)



Profª Drª Silvia Gonzalez-Monteiro

Silvia Gonzalez Monteiro, Dr. (UFSM) - Videoconferência
(Membro efetivo da banca)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Um trabalho científico não é gerado por um único indivíduo. Somente a união dos conhecimentos permitem grandes descobertas que revolucionam o mundo. Assim, devo meu agradecimento a várias pessoas especiais.

Antes de tudo, devo gratidão à minha família. Especialmente, ao meu pai Gilson, minha mãe Elaine, que tanto me apoiam e me motivam para conquistar os meus sonhos.

Às minhas três referências de mulheres independentes e donas de si, minha mãe, minha dinda Solange e minha Vó Assunta (*in memoriam*), expresso meu obrigada pelos ensinamentos de vida, força, independência e posicionamento feminino, espero honrar esse legado.

Agradeço imensamente ao meu namorado Weliton, pelo total apoio e incentivo na minha trajetória profissional, sempre buscando e ressaltando o melhor de mim, principalmente nos momentos difíceis. Obrigada pelas conversas nas horas de desespero, quando o “mundo estava caindo em cima de mim”, sem dúvida tu desempenhas um papel essencial na minha vida. Não posso esquecer de agradecer a tua paciência e incansáveis perguntas quando explicava os resultados da pesquisa, te apresentava o sistema purinérgico, a neurogênese, a toxoplasmose e a curcumina. Acredito que um futuro engenheiro civil aprendeu um pouco destes temas, principalmente pela minha eterna repetição.

Ao meu irmão Emanuel, meu primo Pedro e minha prima e afilhada Beatriz agradeço pelos momentos de descontração, lembrando-me que a vida não é feita somente de trabalho.

Não posso deixar de ressaltar a importância que duas pessoas brilhantes tiveram na realização deste trabalho. Priscila e Nathieli, vocês me inspiram e ganharam meu respeito e admiração pessoal e profissional. Vocês são incansáveis para ajudar os outros, são cientistas excepcionais, o futuro espera grandes realizações de vocês. Minha eterna gratidão pela ajuda, não tenho palavras para agradecer o quanto vocês fizeram por mim.

Ao meu orientador Aleksandro, agradeço pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela confiança e ensinamentos que levarei por toda minha vida. Estendo meu obrigada para as professoras Vera Morsch e Maria Rosa Chitolina pelo acolhimento e ensinamentos desde que iniciei no Enzitox.

Meu obrigada aos professores da Universidade Franciscana (UFN), Michele Sagrillo, Alencar Machado e Aline Ourique, pela parceria nos estudos *in vitro* com células neurais, curcumina e nanocápsulas de curcumina aos quais renderam grandes resultados para esta dissertação.

Agradeço à banca examinadora pela disponibilidade em avaliar esta dissertação, seus conhecimentos e contribuições são de grande valor para mim, a fim de melhorar o trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica (PPGBTOX) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte institucional e financeiro. Que mais estudantes desenvolvam pesquisas, validando a ciência brasileira de qualidade.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira participaram na realização deste estudo.

*“Você é mais forte do que pensa, mas só se quiser ser. Você ainda vai chorar, ainda vai ter momentos em que vai achar que não consegue continuar. Mas você tem que agir como se fosse conseguir”
(Nicholas Sparks - Noites de tormenta)*

RESUMO

EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE CÉLULAS NEURAIS, DIFERENCIAÇÃO NEURAL E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS COM TOXOPLASMOSE

AUTORA: Bianca Fagan Bissacotti

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Suas características de encistamento e persistência, preferencialmente no sistema nervoso central de mamíferos, são preocupantes, além disso a transmissão placentária merece atenção pela possibilidade de causar abortos, malformações e distúrbios comportamentais. O desenvolvimento cerebral durante a embriogênese é altamente comprometido pelo parasito, interferindo na quantidade celular, migração e diferenciação de células precursoras neurais. A participação do sistema purinérgico na defesa imune e neuroproteção na toxoplasmose, vem ganhando destaque, além de que componentes purinérgicos são encontrados na neurogênese. Apesar da grave patogenicidade do parasito, com ampla distribuição mundial e alta prevalência de transmissão vertical, não existem terapias eficazes diante da fase crônica da doença, uma vez que medicamentos disponíveis não atuam no cisto tecidual. As problemáticas apresentadas e os dados epidemiológicos motivam o estudo e a busca por novas terapias a fim de minimizar os danos gerados pelo parasito em uma infecção congênita, para isso propomos o uso da curcumina como um possível tratamento. A curcumina é um polifenol encontrado em maiores concentrações nas raízes da planta *Curcuma longa* e amplamente utilizado na literatura científica devido a suas capacidades antioxidante e anti-inflamatória, além da atuação neuroprotetora em distúrbios envolvendo o sistema nervoso central e resultados promissores em poucos estudos na toxoplasmose. Apesar dessas características benéficas, a curcumina apresenta baixa biodisponibilidade, com rápido metabolismo e certa toxicidade, vista principalmente a nível hepatobiliar e reprodutor. No caso do sistema nervoso central, não existem estudos demonstrando concentrações/doses seguras em modelos saudáveis. Uma vez que nosso objetivo geral foi avaliar os efeitos da curcumina na sinalização purinérgica e na neurogênese de células precursoras neurais do telencéfalo de embriões oriundos de camundongos infectados e não infectados com *Toxoplasma gondii*, antes de mais nada foi imprescindível estudar o impacto da utilização deste polifenol e de duas nanocápsulas de curcumina em células originárias do sistema nervoso central. A exposição dos tratamentos nas linhagens celulares de micrógliã e neurônios revelou que as concentrações entre 1-5 μM , da curcumina, NC-PCL e NC-EDG, podem ser usadas em modelos *in vitro* de doenças cerebrais, pois não afetam consideravelmente a homeostase celular. Diante deste achado, seguimos com o isolamento das células precursoras neurais infectadas com a cepa VEG do *Toxoplasma gondii*. Nossos resultados complementam a interferência do parasito na diferenciação neural, mas o uso da curcumina conseguiu restaurar a gliogênese e aumentar ainda mais a neurogênese, com recuperação do tamanho celular. Alteração na expressão dos receptores purinérgicos também foram visualizados na infecção, o uso da curcumina impediu a resposta imune excessiva, com controle do dano celular, pela diminuição na expressão dos receptores P2X7 e A2A, assim como sua ação neuroprotetora foi aumentada frente a ativação do receptor purinérgico A1. A via de sinalização ERK $\frac{1}{2}$, responsável pela produção de mediadores inflamatórios e proliferação celular, foi regulada pela curcumina a fim de atenuar as respostas pró-inflamatórias e controle da proliferação celular. Juntos, esses resultados demonstram-se promissores quanto ao uso da curcumina para tratamento da toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: Células precursoras neurais. Curcumina. Neurogênese. Sistema purinérgico. *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

EFFECTS OF CURCUMIN ON NEURAL CELLS, NEURAL DIFFERENTIATION, AND PURINERGIC SIGNALLING IN MICE EMBRYOS WITH TOXOPLASMOSIS

AUTHOR: Bianca Fagan Bissacotti

ADVISOR: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. Its characteristics of encystment and persistence, preferably in the central nervous system of mammals, are worrying, in addition to placental transmission deserves attention due to the possibility of causing miscarriages, malformations and behavioural disturbances. Brain development during embryogenesis is highly compromised by parasite, interfering with cell quantity, migration and differentiation of neural precursor cells. The role of the purinergic system in immune defence and neuroprotection in toxoplasmosis has been gaining attention, in addition to the fact that purinergic components are found during neurogenesis. Despite the serious pathogenicity of the parasite, with a wide distribution worldwide and a high prevalence of vertical transmission, there are no effective therapies in the chronic phase of the disease, as available drugs do not act on tissue cysts. The problems presented and the epidemiological data motivate this study and the search for new therapies to minimize the damage caused by the parasite in congenital infection, here we propose the use of curcumin as a possible treatment. Curcumin is a polyphenol found in higher concentrations in the roots of the *Curcuma longa* plant and is widely used in scientific literature due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, in addition to its neuroprotective action in disorders involving the central nervous system and promising results in a few studies on toxoplasmosis. Despite these beneficial characteristics, curcumin has low bioavailability, with rapid metabolism and certain toxicity, mainly seen at the hepatobiliary and reproductive systems. In the case of the central nervous system, no studies are demonstrating safe concentrations/doses in healthy models. Since our general objective was to evaluate the effects of curcumin on purinergic signalling and neurogenesis of neural precursor cells in the telencephalon of embryos from infected and uninfected mice with *Toxoplasma gondii*, first of all, it was essential to study the impact of the use of this polyphenol and two curcumin nanocapsules in cells originating from the central nervous system. Exposure of treatments in microglia and neuron cell lines revealed that concentrations between 1-5 μM of curcumin, NC-PCL, and NC-EDG can be used in *in vitro* models of brain diseases, as they do not significantly affect cell homeostasis. Given this finding, we continued with the isolation of neural precursor cells infected with the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. Our results complement the parasite interference in neural differentiation, but the use of curcumin was able to restore gliogenesis and further increase neurogenesis, with cell size recovery. Changes in the expression of purinergic receptors were also seen in the infection, the use of curcumin prevented an excessive immune response, with control of cell damage, by decreasing the expression of P2X7 and A2A receptors, as well as its neuroprotective action, was increased against receptor activation purinergic A1. The ERK $\frac{1}{2}$ signalling pathway, responsible for the production of inflammatory mediators and cell proliferation, was regulated by curcumin to attenuate pro-inflammatory responses and control cell proliferation. Together, these results show promise for the use of curcumin for the treatment of congenital toxoplasmosis.

Keywords: Neural progenitor cells. Curcumin. Neurogenesis. Purinergic system. *Toxoplasma gondii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estágios do ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	24
Figura 2 – Ciclo biológico do <i>T. gondii</i>	25
Figura 3 – Rotas de infecção materna com <i>T. gondii</i> , com possível transmissão congênita	27
Figura 4 – Áreas neurogênicas em roedores e humanos	31
Figura 5 – Representação do processo de neurogênese embrionária e adulta...	32
Figura 6 – Componentes do sistema purinérgico	37
Figura 7 – Mecanismos microbicidas para controle da infecção por <i>T. gondii</i> em macrófagos	39
Figura 8 – Sinalização purinérgica na neurogênese embrionária	41
Figura 9 – Componentes da sinalização purinérgica que atuam na neurogênese adulta	43
Figura 10 – Planta, raízes e pó das raízes da <i>Curcuma longa</i> e estrutura química da curcumina	44
Figura 11 – Exemplos de alvos moleculares da curcumina	46
Figura 12 – Delineamento experimental da toxoplasmose congênita e neurogênese <i>in vitro</i>	49
Figura 13 – Delineamento experimental para análise da segurança quanto ao uso da curcumina, NC-EDG e NC-PCL em células neurais	101
Figura 14 – Modulação da curcumina e do <i>T. gondii</i> , <i>in vitro</i> , na diferenciação neurônio-gliial, na expressão de receptores purinérgicos e na via de sinalização ERK ½	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AKT ou PKB	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AP-1	Proteína ativadora 1
AR	Receptor andrógeno
Arh-R	Receptor de hidrocarboneto arílico
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Proteína de linfoma de células B2
Bcl-xl	Linfoma de células B extra grandes
BHE	Barreira hematoencefálica
BO	Bulbo olfatório
<i>C. longa</i>	<i>Curcuma longa</i>
cAK	Proteína quinase ativada por autofosforilação
CASP-1	Caspase 1
CASP-2	Caspase 2
CBP	Proteína de ligação CREB
CDPK	Proteína quinase dependente de cálcio
CNE	Células neuro epiteliais
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPI	Células progenitoras intermediárias
cPK	Proteamina quinase
CPN	Células precursoras neurais
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
DNApol	DNA polimerase
E-5'NT	Ecto 5' nucleotidase ou CD73
eATP	ATP extracelular
EDG	Eudragit
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGF-R	Receptor EGF
EGFRK	Receptor de quinase EGF
ELAM-1	Molécula de adesão endotelial-leucócito 1

E-NPPs	Ectonucleotídeo pirofosfatase e/ou fosfodiesterase
E-NTPDase	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
EPC-R	Receptor de proteína endotelial C
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fas-R	Receptor do primeiro sinal de apoptose
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fator de crescimento de fibrilar
FMR	Fluxo migratório rostral
FPTase	Proteína farnesil transferase
Gcl	Glutamato cisteína ligase
GD	Giro denteado
GFAP	Proteína fibrilar glial ácida
GR	Células da glia radial
GST	Glutathione S transferase
H2-R	Receptor de histamina 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HIF-1	Fator induzível por hipóxia 1
HO	Hemeoxigenase
Hsp-70	Proteínas de choque térmico 70
IAP	Proteína inibitória de apoptose
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IKK	Inibidor do fator nuclear kappa B
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de interleucina 1 beta
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-8R	Receptor de interleucina 8
iNOS	Sintase óxido nítrico induzível
IR	Receptor de integrina
JAK	<i>Janus</i> quinase
JNK	c-jun-N-terminal quinase
LDL-R	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipoxigenase

MAPK	Proteína quinase ativadora de mitógeno
MMP	Metaloproteinase matriz
mtROS	Espécies reativas de oxigênio mitocondrial
NC-EDG	Nanocápsula de eudragit contendo curcumina
NC-PCL	Nanocápsula de poli- ϵ -caprolactona contendo curcumina
nCPI	Células progenitoras intermediárias de neurônios
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento nervoso
oCPI	Células progenitoras intermediárias de oligodendrócitos
OMS	Organização mundial da saúde
ON	Óxido nítrico
PCK	Proteína quinase C
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PhK	Fosforilase quinase
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
SNC	Sistema nervoso central
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TK	Proteína tirosina quinase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	TOXOPLASMOSE	23
1.2	NEUROGÊNESE	29
1.2.1	Etapas da neurogênese: proliferação, migração e diferenciação ...	30
1.2.2	Fatores que interferem na neurogênese	32
1.2.3	Modelo de neurogênese <i>in vitro</i>: células precursoras neurais e neuroesferas	34
1.3	SISTEMA PURINÉRGICO	36
1.3.1	Sistema purinérgico e toxoplasmose	37
1.3.2	Sistema purinérgico na neurogênese	40
1.4	CURCUMINA	43
2	OBJETIVOS	50
2.1	OBJETIVO GERAL	50
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3	MÉTODOS E RESULTADOS	51
3.1	ARTIGO	51
3.2	MANUSCRITO	79
4	DISCUSSÃO	100
5	CONCLUSÃO	107
6	PERSPECTIVAS	109
	REFERÊNCIAS	110
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (CEUA/UFSM)	121

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença parasitária que acomete muitas espécies animais e humanos no mundo todo. A doença, causada pela espécie *Toxoplasma gondii*, muitas vezes se apresenta de forma assintomática e inofensiva para imunocompetentes. Uma das maiores preocupações volta-se para a transmissão congênita do parasito, que consegue ultrapassar a barreira placentária e infectar o embrião. Um dos principais prejuízos do *Toxoplasma* à fase embrionária ocorre, nesse caso, na formação do sistema nervoso central (SNC), que apesar da sua complexidade de eventos morfogênicos altamente precisos, o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), consegue atuar maleficamente prejudicando esse processo tão valioso.

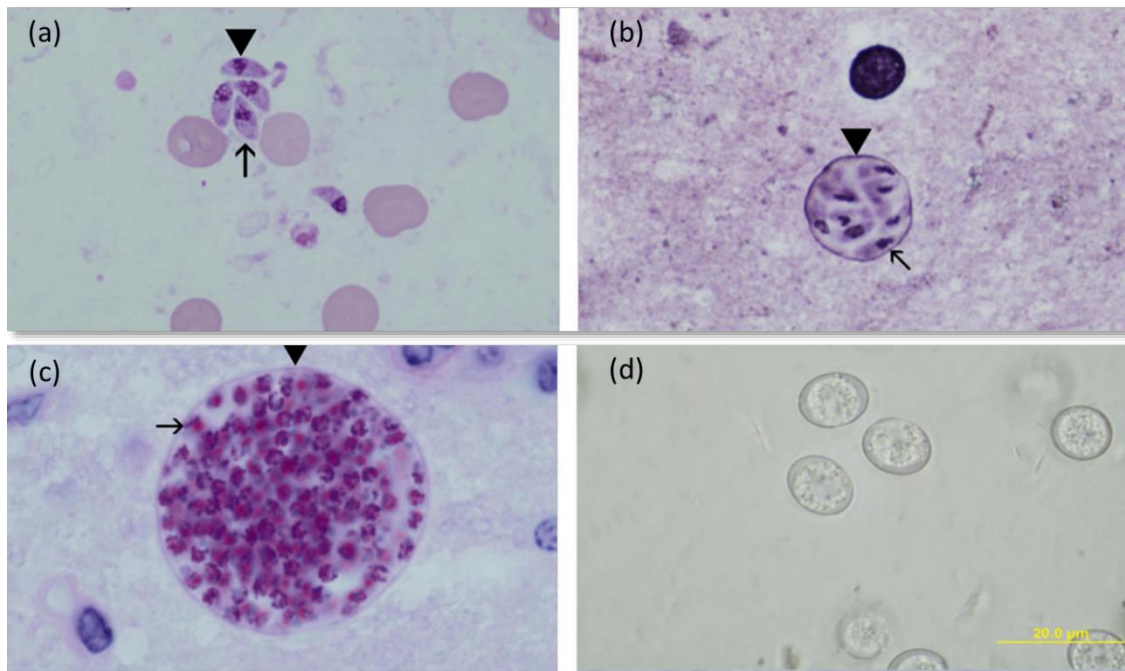
Na formação do SNC sem danos, centenas de bilhões de neurônios geram conexões entre si. O cérebro consegue armazenar e processar informações que chegam de todo o organismo em segundos, atuando de forma altamente complexa e organizada. Memórias, sentimentos e ações são controlados por essa maquinaria cerebral e realmente, há muito ainda o que precisamos entender sobre ele.

Apesar dessa complexidade, não é preciso muito estudo, ler livros complicados de neurociência ou ser um expert nessa área para reconhecer a importância do cérebro para o corpo humano. Quando existem quaisquer agentes que podem, de alguma forma, prejudicar sua formação enquanto ainda na concepção é imprescindível o engajamento afim de proporcionar soluções para esse grave problema, que compromete totalmente a vida das populações.

1.1 TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório *T. gondii*. Essa zoonose é uma patologia negligenciada, mas que possui grande importância médica e veterinária por ser muito difundida no mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada cronicamente por toxoplasmose, sendo no Brasil a soroprevalência em humanos de 40 a 80% (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DUNAY et al., 2018; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). O ciclo de vida do parasito envolve três formas infecciosas: taquizoítos (infecção aguda), bradizoítos (infecção crônica) e oocistos (forma infectante, esporulados ou não esporulados) (Figura 1).

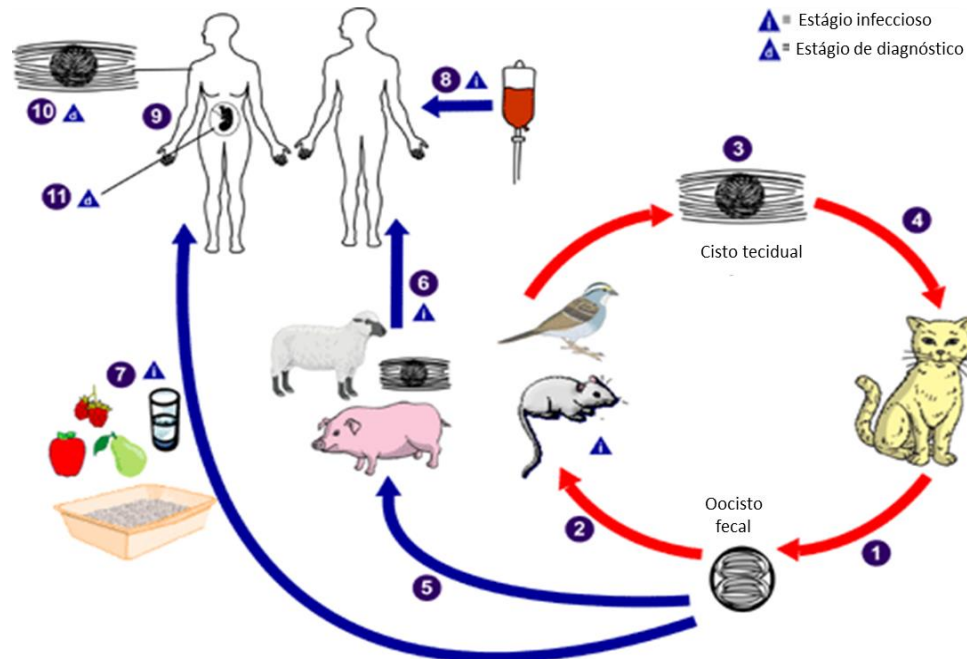
Figura 1 – Estágios do ciclo de vida do *T. gondii*.



(a) Taquizoítos em esfregaço sanguíneo; (b) Pequeno cisto em tecido; (c) Cisto contendo bradizoítos em tecido; (d) Oocistos não esporulados nas fezes de gato. Fonte: Dubey (2014).

O ciclo biológico do parasito é característico do tipo heteroxeno facultativo sendo este capaz de infectar e se multiplicar em todas as células nucleadas de mamíferos e aves (Figura 2). A fase sexuada é enteroepitelial e ocorre no hospedeiro definitivo, já a fase assexuada é extraintestinal ocorrendo no tecido dos hospedeiros intermediários e definitivos (DUBEY, 2014; DUBEY et al., 2012).

Os únicos hospedeiros definitivos do *T. gondii* são da família *Felidae*, principalmente os gatos domésticos. Os oocistos não esporulados são eliminados nas fezes dos gatos e levam de 1-5 dias para esporular no ambiente e tornar-se infectantes. Os hospedeiros intermediários são animais de sangue quente, como pássaros, roedores e seres humanos (DUBEY, 2014; DUBEY et al., 2012; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A ingestão de água ou alimentos contaminados com os oocistos ou consumo de carnes mal-cozidas contendo os cistos teciduais são os principais meios de transmissão da doença. Os seres humanos também podem ser infectados através de transfusão de sangue, transplante de órgãos ou transplacentalmente da gestante para o feto (CDC, 2018; DUBEY, 2014).

Figura 2 – Ciclo biológico do *T. gondii*.

Felídeos contaminados com *T. gondii* liberam em suas fezes oocistos infectantes (1), podendo ser ingeridos por roedores ou pássaros (2) transformando-se em cistos teciduais logo após consumidos (3). Os gatos são infectados após consumir esses hospedeiros intermediários contaminados (4). Animais criados para consumo humano também podem ser infectados com a ingestão de oocistos esporulados no ambiente (5). Os seres humanos podem ser infectados por várias rotas: ingestão de carne mal cozida dos animais criados para consumo (6), consumo de alimentos ou água contaminada (7), transfusão de sangue ou transplante de órgãos (8) e pela rota transplacentária (9). No corpo humano, o parasito pode formar cistos teciduais (10), que podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro. O diagnóstico pode ser feito por sorologia, biópsias (10) e a infecção congênita confirmada pela detecção do DNA do *T. gondii* no líquido amniótico por meio de métodos moleculares (11).
Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2018).

Seguindo o ciclo infeccioso do parasito, a ingestão de oocistos e sua chegada no intestino humano, leva ao rompimento destes e liberação de esporozoítos, que invadem os enterócitos, assim passando a ser chamados de taquizoítos. Essa forma pode dividir-se várias vezes rompendo a célula hospedeira e progredindo para as células sanguíneas e tecidos, caracterizando a fase aguda com rápida replicação e disseminação por todo corpo (CDC, 2018; DUBEY, 2014). Se tratando de um organismo imunocompetente, uma vez que o *T. gondii* entra em contato com as células epiteliais do hospedeiro, a profilina, uma proteína de superfície do parasito, é reconhecida pelos receptores *Toll-Like* 11 e/ou 12 das células dendríticas, desencadeando uma resposta imune a fim de causar apoptose do antígeno, impedindo sua sobrevivência no hospedeiro (HOU et al., 2011; YAROVINSKY, 2014).

Quando o sistema imune está comprometido, não há controle sobre a invasão do parasito no organismo, portanto, o desenvolvimento da fase crônica depende muito

da imunidade do hospedeiro para ocorrer. Os taquizoítos livres no sangue infectam novas células e diferenciam-se em bradizoítos, que se multiplicam mais lentamente que os taquizoítos e estão menos acessíveis a resposta imune por se localizarem no interior de cistos teciduais possibilitando o escape do sistema imunológico e levando a infecção persistente (BAK et al., 2018; CDC, 2018; HOU et al., 2011; KIM; BOOTHROYD, 2005; YAROVINSKY, 2014).

Sabendo da existência de fase aguda e crônica da doença, um estudo da genotipagem do parasito revela que de acordo com a cepa infecciosa que acomete o indivíduo, sintomas comuns e característicos são observados (FERREIRA et al., 2004; HOWE; SIBLEY, 1995). A cepa tipo I, como a RH, é descrita por ser altamente virulenta e associada aos casos humanos de toxoplasmose aguda. O genótipo tipo II, cepa ME49, por exemplo, é predominante em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e responsável pelos casos de toxoplasmose ocular e congênita. Já as do tipo III, como a VEG, são moderadamente virulentas e encontradas em animais, sendo na maioria das vezes sintomáticas em humanos e responsável por infecções crônicas (formação de cistos teciduais), e assintomáticas em animais. A cepa tipo VEG foi utilizada nesse estudo por ser um modelo que mimetiza a forma de infecção da doença em humanos, através do consumo de água ou alimentos contaminados, e caracterizada pela cronificação da doença no cérebro (FERREIRA et al., 2004; HOWE; SIBLEY, 1995).

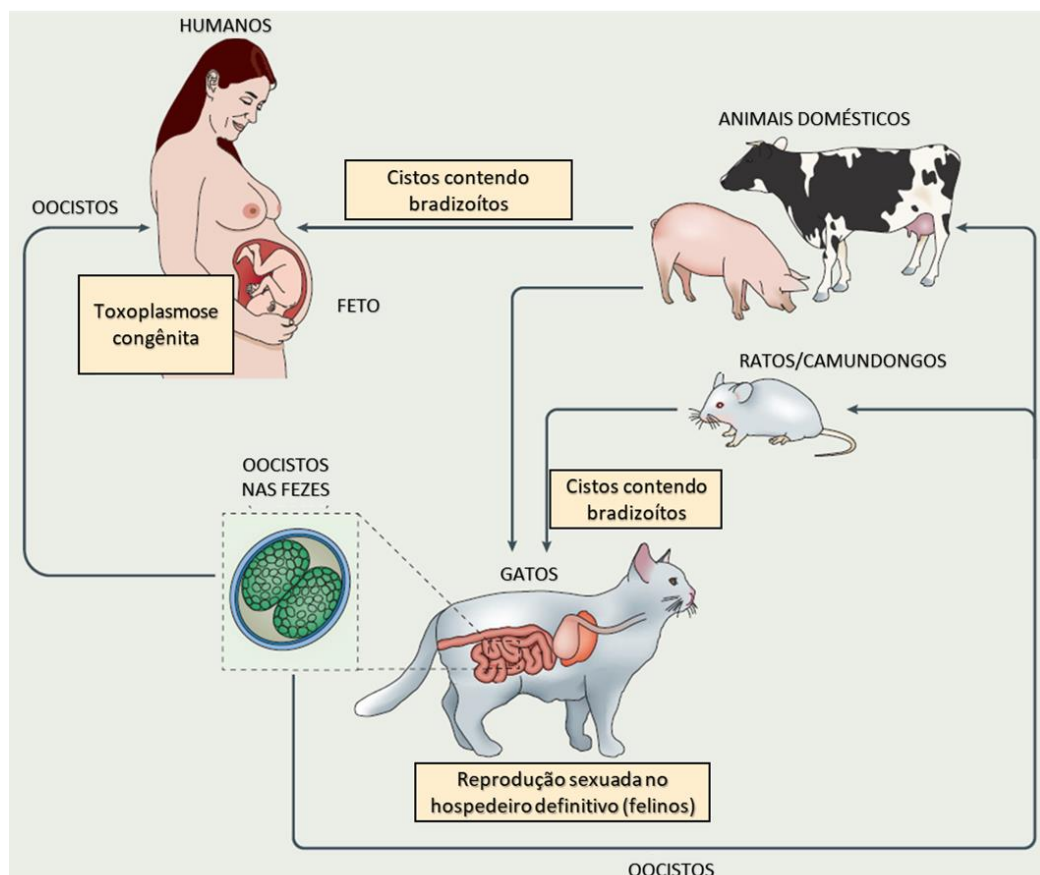
Quando em fase crônica, o parasito pode encistar vários órgãos como fígado, pulmão, gânglios linfáticos, olhos, tecido muscular esquelético e cardíaco, estabelecendo uma infecção latente ao longo da vida e o SNC está associado à maioria das complicações (DUBEY, 2014; MENDEZ; KOSHY, 2017). Em humanos e roedores, o cérebro é o principal órgão de encistamento e persistência (REMYINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

O *T. gondii* ultrapassa tanto a barreira hematoencefálica (BHE) quanto a transplacentária. Alguns autores indicam que os parasitos migram para o cérebro sete dias após a infecção e permeiam a BHE por um mecanismo chamado de “cavalo de Tróia”, por se “esconderem” dentro das células imunes (ASHOUR, 2018; BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Em adultos acometidos, a cronificação do parasito no cérebro desencadeia alterações em funções neurais, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças comportamentais e neuropsiquiátricas (MENDEZ; KOSHY, 2017; PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015), por exemplo, depressão (ALVARADO-ESQUIVEL et al.,

2016), comportamento suicida (BAK et al., 2018), alteração obsessiva compulsiva (CHEGENI et al., 2019) e até mesmo esquizofrenia (XIAO et al., 2018) são demonstrados em estudos recentes.

As anormalidades causadas pelo *T. gondii* ao SNC podem ser ainda mais pronunciadas na infecção congênita, uma vez que a alteração da diferenciação das células precursoras neurais (CPN) contribui para o desenvolvimento do processo inflamatório (MENDEZ; KOSHY, 2017) podendo induzir ao aborto, morte fetal ou ocasionar sequelas que podem ser descobertas ainda no útero, como malformações, ou apenas nos primeiros meses de vida com o acometimento visual em graus variados, retardo mental, crises convulsivas, anormalidades motoras, surdez, coriorretinite, alterações comportamentais e outras (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; GOMES; BARBOSA, 2017). Os meios de contaminação das gestantes com *T. gondii* estão ilustrados na figura 3.

Figura 3 – Rotas de infecção materna com *T. gondii*, com possível transmissão congênita.



Fonte: Adaptado de Yarovinski (2014).

Os dados epidemiológicos de transmissão congênita da toxoplasmose indicam variação conforme o local. Nos Estados Unidos a incidência é de 1:10.000 nascidos vivos e na Europa 1 a 3 para cada 10.000 (COSTA, 2013). Já o Brasil destaca-se como um país que apresenta alta soroprevalência de toxoplasmose, a forma congênita varia de 4 a 10 casos para cada 10.000 nascidos vivos (DUBEY et al., 2012; FIALHO; TEIXEIRA; ARAUJO, 2018; LOVISON; RODRIGUES, 2017). Além do mais, infecções materno-fetais adquiridas no primeiro trimestre de gestação impactam entre 10-25% dos casos congênitos e a partir do segundo trimestre, a infecção varia de 30-65% (ELSHEIKHA, 2008; HILL; DUBEY, 2018; KHAN; KHAN, 2018).

Um estudo realizado no Rio Grande do Sul avaliou a incidência de toxoplasmose congênita em um hospital durante 10 anos e verificou que a taxa de transmissão ao feto varia de 50-60% em mães que não foram tratadas e de 25-30% em mães tratadas durante a gestação (BISCHOFF et al., 2014). Surtos de toxoplasmose tem ocorrido em diversos países e afetado a qualidade de vida de muitas pessoas, com problemas crônicos e irreversíveis. No ano de 2018, a cidade de Santa Maria no RS teve um dos maiores surtos de toxoplasmose mundial, o último boletim epidemiológico, divulgado em outubro de 2018 pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde do RS, indicava 809 pessoas infectadas, com diagnóstico confirmado por exame laboratorial e apresentando problemas oculares, principalmente. Além disso, mulheres grávidas infectadas (114 gestantes) tiveram problemas, como aborto (10 casos de abortos e 3 de óbitos fetais); além, de seus filhos nascerem com sequelas da doença (SANTA MARIA, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 1999, os tratamentos em casos de toxoplasmose congênita incluem poucos protocolos terapêuticos amplamente utilizados. Para o tratamento tanto de gestantes quanto de crianças infectadas congenitamente indica-se a utilização conjunta de antibióticos, como pirimetamina e sulfametoxazol ou clindamicina, acrescido de ácido fólico (DUNAY et al., 2018; PETERSEN, 2007). Ambos, pirimetamina e sulfametoxazol atuam no parasito e são antagonistas do folato que inibe a duplicação do DNA, mecanismos de extrema importância durante o processo de desenvolvimento do feto, por esse motivo é de extrema importância a suplementação de ácido fólico. Já a clindamicina possui mecanismo tóxico ao parasito por ligar-se a açúcares da membrana celular e inibir a síntese de proteínas. Um outro medicamento recomendado para casos de toxoplasmose materna aguda é a espiramicina, que atua também inibindo a síntese

proteica do parasito, conseguindo atravessar a barreira transplacentária (ANTCZAK; DZITKO; DŁUGOŃSKA, 2016; DUNAY et al., 2018).

Apesar das problemáticas já citadas acima, os poucos medicamentos disponíveis não apresentam total eficácia no combate ao parasito, especialmente para tratar a forma crônica da doença, uma vez que nenhum fármaco é capaz de erradicar a forma encistada do *T. gondii* nos tecidos (DUNAY et al., 2018). Somado a isso, seu uso pode gerar certos efeitos colaterais, toxicidade, leucopenia, trombocitopenia e erupções cutâneas (KAPLAN et al., 2009; LOPES et al., 2007).

Tendo em vista as características da doença parasitária, seus dados epidemiológicos e suas problemáticas, é de extrema importância estudar de forma ampla as etapas da formação neural e investigar, nesse sentido, quais mecanismos o parasita atua maleficamente.

1.2 NEUROGÊNESE

A formação de um mamífero depende inicialmente do encontro do ovócito com o espermatozoide, os quais formam o zigoto, uma célula totipotente que sofre sucessivas divisões até a formação da mórula e após, blastocisto. A camada externa de células, desta esfera oca formará o trofoblasto, o qual possui células internas pluripotentes que darão origem ao embrião. A partir da terceira semana de gestação, o desenvolvimento da notocorda e diferenciação de três camadas germinativas caracterizam a gastrulação. Os três folhetos embrionários são endoderme, dará origem ao sistema digestivo; mesoderme, as células tronco multipotentes sofrerão diferenciação para originar tecido muscular, circulatório, rins, ossos e órgãos reprodutivos; e finalmente, a ectoderme responsável pela formação do sistema nervoso (DE GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012; MOORE, 2013).

Células-tronco multipotentes neurais são capazes de originar células nervosas como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (BOLDRINI et al., 2018; MOORE, 2013). A complexidade e organização do SNC requerem que sua formação seja desencadeada por mecanismos confiáveis e precisos. Por isso, durante a metade da terceira semana de gestação, a placa neural é formada por proliferações das células multipotentes e sucessivas invaginações na ectoderme, processo denominado neurulação. No final dessa semana gestacional, a crista neural e o tubo neural são gerados, a crista neural ainda sofre separação em duas partes alojando-se nas

laterais do tubo neural, neste local ocorrerá o desenvolvimento de gânglios espinais e sensitivo craniais (METZGER; SIMUNOVIC; BRIVANLOU, 2018; MOORE, 2013).

O tubo neural formará vesículas cerebrais: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. É o prosencéfalo responsável pela formação do telencéfalo e diencefalo, mesencéfalo permanece sem divisões e o rombencéfalo formará metencéfalo e mielencéfalo. A partir dessas cinco vesículas o encéfalo é desenvolvido (DE GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012).

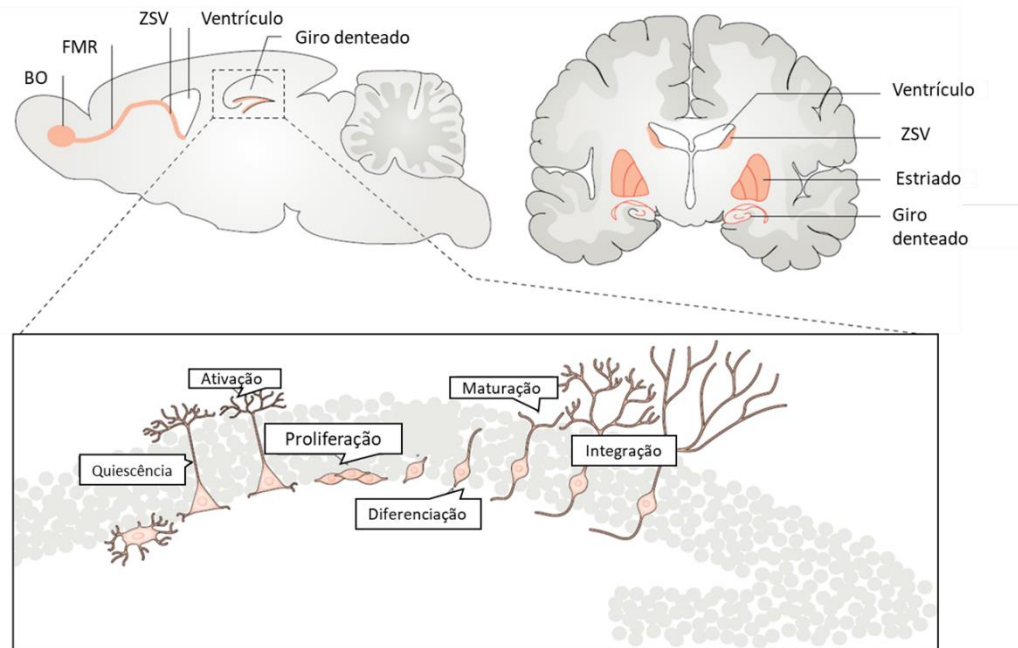
1.2.1 Etapas da neurogênese: proliferação, migração e diferenciação

O termo neurogênese é utilizado para se referir a formação de neurônios, o qual possui uma série de etapas, a proliferação, a migração e a diferenciação. A camada de células do tubo neural é formada por células neuroepiteliais multipotentes que precisam se deslocar para locais específicos para sua diferenciação e formação do encéfalo. Durante a formação do tubo neural, as células neuroepiteliais (CNE) das pregas neurais migram para formar a crista neural, induzindo a diferenciação em neurônios e glias (AIMONE et al., 2014; FARKAS; HUTTNER, 2008; ZHAO; DENG; GAGE, 2008).

Quando as CPNs (células da glia radial - GR e CNE) adquirem características de especificação neural após a proliferação, elas migram para a camada granular, estendem seus axônios, assim maturam e dão origem às células maduras que estabelecem conexões e sinapses a fim de gerar características funcionais e fisiológicas (FARKAS; HUTTNER, 2008).

Antigamente acreditava-se que a neurogênese ocorria somente durante o desenvolvimento embrionário, mas já é sabido que na fase adulta humana são gerados aproximadamente 700 novos neurônios diários no hipocampo, dependendo do estímulo (SPALDING et al., 2013). CPN são encontradas em mamíferos adultos, chamadas zonas neurogênicas, como a zona subgranular (ZSG) do giro denteado do hipocampo (GD) e na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais (Figura 4) (DENOTH-LIPPUNER; JESSBERGER, 2021; ERIKSSON et al., 1998; KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009; SPALDING et al., 2013; URBACH; WITTE, 2019).

Figura 4 – Áreas neurogênicas em roedores e humanos.

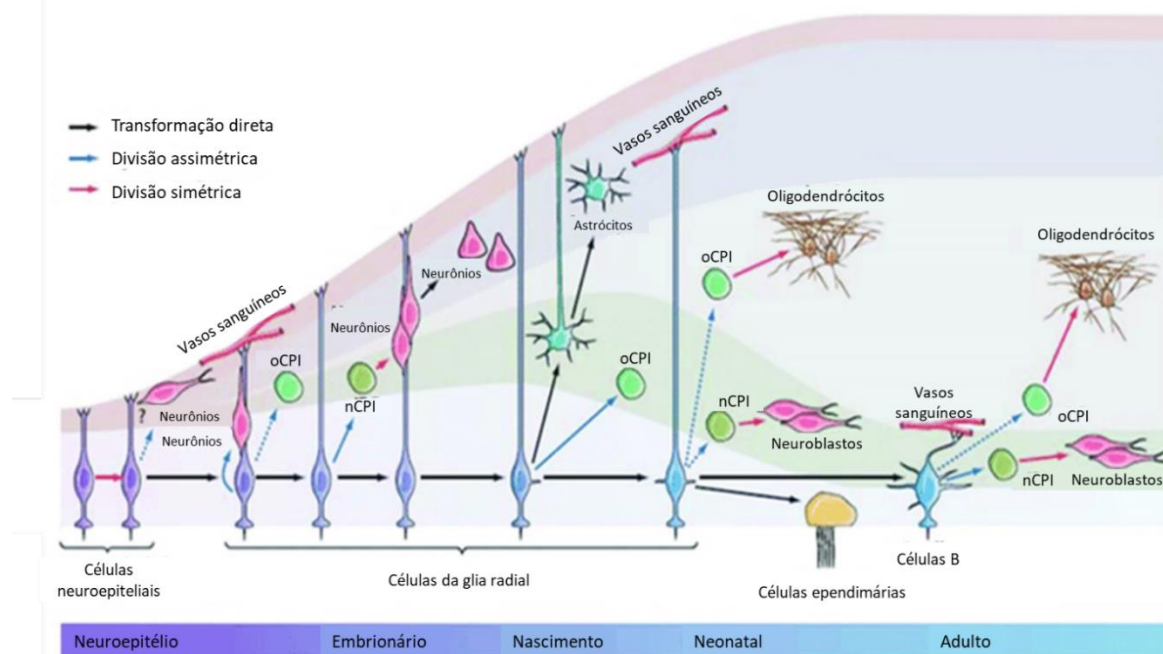


Fonte: Adaptado de Denoth-Lippuner; Jessberger (2021). Abreviações estão na lista de abreviaturas e siglas.

As fases da neurogênese embrionária e adulta serão descritas de acordo com a figura 5, mas podem ser visualizados também nas figuras 8 e 9 (tópico 1.3.2). No início do desenvolvimento, CNE proliferam por divisão simétrica, ou seja, geram novas CNE, assim a parede do tubo neural torna-se mais espessa. Essas CNE dão origem às células GR, e também há a geração direta de neurônios. Células GR, assimetricamente, dividem-se em neurônios ou células progenitoras intermediárias (oCPI, nCPI) que se diferenciarão em neurônios e oligodendrócitos (KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2019; SPALDING et al., 2013; URBACH; WITTE, 2019).

Com o passar do processo, GR e CPIs movem-se para outras camadas e o crescimento do cérebro alonga novamente células GR. No final do desenvolvimento há a produção de astrócitos e o mantimento das GR no recém-nascido continuam se diferenciando em neurônios e oligodendrócitos, alguns transformando-se em células endimárias (neuroglia epitelial). As células B mantêm uma organização epitelial com contato apical no ventrículo e terminações basais nos vasos sanguíneos, gerando neurônios, oligodendrócitos e astrócitos na fase adulta (DENOTH-LIPPUNER; JESSBERGER, 2021; KRIEGSTEIN; ALVAREZ-BUYLLA, 2009; OBERNIER; ALVAREZ-BUYLLA, 2019).

Figura 5 – Representação do processo de neurogênese embrionária e adulta.



Fonte: Adaptado de Kriegstein; Alvarez-Buylla (2009). Abreviações estão na lista de abreviaturas e siglas.

Em cada uma das etapas da neurogênese, os tipos celulares envolvidos produzem proteínas específicas que podem ser utilizados como marcadores imunohistoquímicos para a avaliação do processo, alguns deles são abordados no tópico 1.2.3.

1.2.2 Fatores que interferem na neurogênese

O ciclo celular é uma sequência de eventos que ocorre em uma célula eucariótica, tanto na fase embrionária quanto adulta, no intuito de proliferação. Pode-se dividir esses eventos em G1, S e G2, compreendendo a interfase com maior atividade metabólica, e fase mitótica. Na fase G1, as células aumentam de tamanho produzindo proteínas e RNA que serão úteis para os próximos processos, a fase de síntese ou fase S é onde a replicação do DNA ocorre e a G2 constitui uma fase de preparação para a mitose onde realmente há a divisão celular a partir da célula mãe. É importante destacar que na fase M a divisão pode ocorrer de forma simétrica ou assimétrica, dependendo das informações produzidas na fase G1 (URBACH; WITTE, 2019).

As fases da neurogênese são altamente reguladas pelo ciclo celular a partir de fatores internos e externos envolvidos no ambiente em que a célula está inserida, bem como diversos fatores fisiológicos e/ou patológicos. Portanto alterações na formação

embrionária, com destaque para o tubo neural, interferem na proliferação e diferenciação de CPNs (SHOHAYEB et al., 2018; URBACH; WITTE, 2019).

Fatores de crescimento, neurotróficos, de transcrição, hormônios, neurotransmissores são exemplos de mecanismos intrínsecos que promovem neurogênese, aumento na quantidade de espinhas e ramificações dendríticas e aceleram a maturação neuronal (GONÇALVEZ; SCHAFER; GAGE, 2016; JIN et al., 2003; MUOTRI; GAGE, 2006).

Vias de sinalização e contato célula a célula atuam na facilitação da mitose de CPN (PALMER; WILLHOITE; GAGE, 2000). Neurotransmissores também atuam nas zonas neurogênicas cerebrais por expressarem receptores de ATP, glutamato e acetilcolina de CPN promovendo sua proliferação e diferenciação (RATHBONE et al., 1999; RIBEIRO et al., 2019).

Micróglia durante a neurogênese atuam na liberação de interleucinas e contato célula-célula, astrócitos são responsáveis por liberar fatores de crescimento e neurotrofinas, além da proximidade com a vascularização também representam fatores que modularam a neurogênese (AIMONE et al., 2014; PALMER; WILLHOITE; GAGE, 2000).

Exercício físico, aprendizagem, enriquecimento ambiental são fatores que estimulam a neurogênese, no entanto, privação do sono, ingestão crônica de álcool, drogas, estresse e envelhecimento levam a efeitos contrários (AIMONE et al., 2014; ERIKSSON et al., 1998; MA et al., 2017). Esses exemplos atuam por indução ou bloqueio de fatores neurotróficos, fatores de transcrição e liberação de citocinas inflamatórias, unindo os fatores externos e intrínsecos da célula (SHOHAYEB et al., 2018).

Durante infecções desenvolvidas por um patógeno extracelular, a neurogênese fica prejudicada pelo antígeno alterar a quantidade de CPN e os destinos neurais, resultando na estimulação ou inibição da neurogênese, dependendo das características do agente invasor (BOKSA, 2010).

Existem modelos *in vitro* e *in vivo*, casos clínicos, relatos e revisões da literatura científica indicando que o desenvolvimento da toxoplasmose congênita resulta em sérios danos na formação do SNC do feto, comprometimento das funções neurais e alterações no cérebro de adultos causando doenças cerebrais (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2016; BAK et al., 2018; EL SAFTAWY et al., 2020; MENDEZ; KOSHY, 2017; PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015; XIAO et al., 2018).

Marcos et al. (2020) em cultivo de células GR infectadas com taquizoítos observaram efeito antiproliferativo, juntamente com redução neural e de células oCPIs, comprovando que o parasito interfere na diferenciação neurogênica. Bottari et al. (2019) utilizaram marcadores de diferenciação para estudar neurogênese *versus* gliogênese de CPNs obtidas do telencéfalo de embriões de camundongos infectados congenitamente com *T. gondii*, onde a viabilidade celular e a diferenciação de CPNs foram alteradas. Somando estes achados e corroborando com o primeiro estudo, a infecção alterou migração neural, influenciando na neurogênese e gliogênese. A gliogênese foi favorecida em CPN infectadas, células nestina⁺ (células imaturas) e GFAP⁺ (utilizado como marcador glial, neste estudo) aumentaram consideravelmente, sendo que a quantidade de neurônios maduros (MAP2⁺) é extremamente diminuída na infecção em comparação com o controle. Indo mais além, os autores utilizaram-se de um composto natural como tratamento, o resveratrol, que conseguiu restaurar a neurogliogênese, revelando resultados muito promissores (BOTTARI et al., 2019a).

É importante ressaltar que a explicação para os achados apoptóticos em células infectadas está associada à ativação da via ativadoras de mitógenos MAPK, ERK ½, JNK e p38, a qual está envolvida na neurogênese, dependentemente dos receptores purinérgicos, pelo controle da proliferação celular (veja 1.3.2), bem como a ação anti-inflamatória da curcumina é relatada por inibição desta via de sinalização, que será discutida logo mais no tópico 1.4 (AGGARWAL et al., 2007; LICZBIŃSKI; MICHAŁOWICZ; BUKOWSKA, 2020; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; VALÈRE et al., 2003; WANG et al., 2014).

Desta forma, a neurogênese pode ser modulada através de fatores intrínsecos e extrínsecos, por isso este estudo abordará o papel do parasito *T. gondii* o qual demonstra prejudicar a formação do SNC. Portanto, analisar a diferenciação neural *in vitro* em um modelo de infecção congênita do parasito causador da neurotoxoplasmose apresenta um grande potencial para ser investigado em estudos relacionados à neurogênese.

1.2.3 Modelo de neurogênese *in vitro*: células precursoras neurais e neuroesferas

Modelos *in vitro* para o estudo da neurogênese são propostos para compreender mecanismos moleculares que envolvem os processos de proliferação, maturação e diferenciação celular, podendo ser também indicados para avaliar a ação

de compostos naturais frente a interferentes prejudiciais para neurogênese, objetivo do presente estudo. Células de carcinoma embrionário murino, P19, foi um dos primeiros modelos utilizados para entender a diferenciação celular, na miogênese e neurogênese. O cultivo de células tronco embrionárias, células tronco induzidas e CPNs também são outros modelos *in vitro* (GLASER et al., 2014; MISHRA et al., 2006; TRUJILLO et al., 2012).

O modelo de cultura de CPN oriundas do telencéfalo de embriões de camundongos foi empregado neste trabalho considerando que nosso grupo de pesquisa já faz uso deste protocolo, além de permitir avaliar o efeito de componentes externos durante a neurogênese (BOTTARI et al., 2019a; FRACASSO et al., 2019; REICHERT et al., 2019). O protocolo experimental para avaliar a neurogênese nesta dissertação está especificado na figura 12 (sessão 1.4). As CPNs podem ser isoladas da ZSV do telencéfalo de embriões no 13º dia de gestação (fase de maior proliferação celular, permitindo isolamento de células ainda indiferenciadas) ou ZSG do hipocampo adulto (BREWER; TORRICELLI, 2007; COSTA; JAGASIA; BERNINGER, 2009; HUTTON; PEVNY, 2008).

O cultivo de CPNs necessitam que o meio de cultura seja suplementado com o suplemento neural B-27, fatores de crescimento fibrilar (FGF-2) e epidermal (EGF), para que ocorra crescimento em monocamadas ou agregados conhecidos como neuroesferas (OLIVEIRA et al., 2013; TRUJILLO et al., 2012). Cada neuroesfera formada, no quinto dia de cultivo, representa uma única célula que pode se aderir em superfícies, migrar e diferenciar-se em neurônios ou glias, após a retirada dos fatores de crescimento (BREWER; TORRICELLI, 2007; COSTA; JAGASIA; BERNINGER, 2009; HUTTON; PEVNY, 2008; TRUJILLO et al., 2012).

Para análise da diferenciação neural, marcadores para CPNs, neurônios e glia maduros e imaturos são utilizados. Nestina é uma proteína do filamento intermediário do tipo VI expressa em células nervosas imaturas ou com proliferação intensa, neste modelo, sua marcação é obtida em CPNs, como células-tronco neuroepiteliais, glias radiais e progenitores neurais (WISLET-GENDEBIEN et al., 2003). A proteína glial fibrilar ácida intermediária do filamento do tipo III, GFAP, está no citoesqueleto de células gliais, mas glias radiais, um tipo de CPN, também expressa o marcador (OLIVEIRA et al., 2013; WISLET-GENDEBIEN et al., 2003). NeuN é uma proteína nuclear específica de neurônios, que identifica células neuronais pós mitose, ou seja,

neurônios maduros (KIM; ADELSTEIN; KAWAMOTO, 2009). Já, β 3-tubulina, é uma proteína expressa especificamente para neurônios imaturos (KATSETOS et al., 2003).

Tendo como base as principais características que formam o SNC durante o período embrionário, nos estágios da neurogênese e a influência do parasito *T. gondii* aqui estudado, revisaremos a seguir, como o sistema purinérgico atua nessas situações. A relevância desta via de sinalização é sua presença em situações fisiológicas, regulando a manutenção, proliferação e diferenciação de células-tronco multipotentes, e também mediando vias de sinalização celular que desencadeiam respostas inflamatórias e de sobrevivência/apoptose celular na toxoplasmose (BURNSTOCK; ULRICH, 2011; COUTINHO-SILVA; SAVIO, 2021).

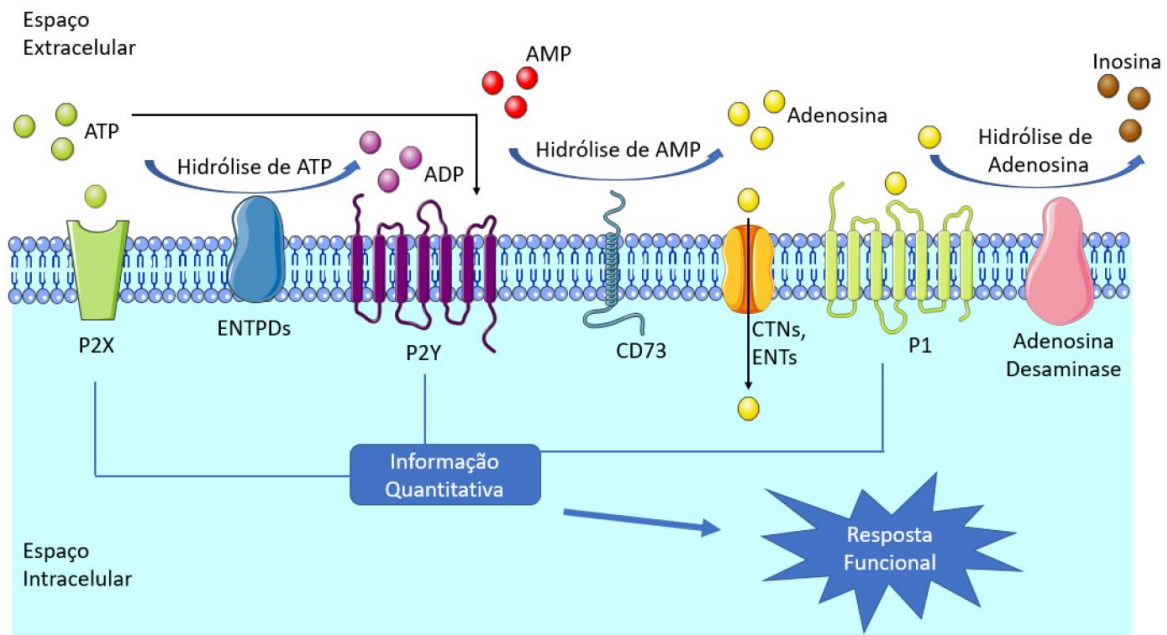
1.3 SISTEMA PURINÉRGICO

A sinalização purinérgica é uma importante via de comunicação célula-célula mantida com o passar da evolução e que está presente em muitos processos neuronais e não neuronais, fisiológicos e patológicos (BURNSTOCK, 2009; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; BURNSTOCK; ULRICH, 2011; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2009; GLASER et al., 2014; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018). Sua descoberta possibilitou a ampliação de função do nucleotídeo ATP além de uma molécula energética metabólica para seu envolvimento em sinalizações celulares (BURNSTOCK, 2009, 2018).

O sistema purinérgico está presente em praticamente todos os tipos de células do organismo e é formado por três componentes: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, receptores e ectoenzimas (BURNSTOCK, 2007, 2018) (Figura 6).

O nucleotídeo ATP é conhecido como um sinal de dano ou padrão molecular associado ao dano, mas sua liberação para o espaço extracelular, em células neurais, é vista tanto em mecanismos fisiológicos quanto em respostas a danos celulares (BURNSTOCK, 2006; DI VIRGILIO, 2005). Quando fora da célula, o ATP pode ativar receptores purinérgicos ionotrópicos do tipo P2X, bem como em menor extensão receptores P2Y metabotrópicos acoplados a proteína G. São reconhecidos em mamíferos sete tipos de receptores P2X (1-7) e oito do tipo P2Y (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14), responsáveis pelo reconhecimento dos nucleotídeos de ATP e ADP, e quatro receptores do tipo P1 (A1, A2A, A2B e A3) que reconhecem a adenosina e são acoplados a proteína G (BURNSTOCK, 2018; FREDHOLM et al., 1994).

Figura 6 – Componentes do sistema purinérgico.



Fonte: Mostardeiro (2021).

A partir da liberação de ATP para o meio extracelular, através do transporte por exocitose, transportadores de ligação ao ATP, hemicanais de conexina ou panexina, canais aniônicos dependentes de voltagem ou transportadores de nucleotídeos vesiculares, sua degradação e de outros nucleotídeos é altamente controlada por enzimas do sistema purinérgico, denominadas ectonucleotidases (ABBACCHIO et al., 2009; SAWADA et al., 2008). O ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) e ectonucleotídeo pirofosfatase e/ou fosfodiesterases (E-NPPs) hidrolisam ATP e ADP a AMP. A conversão de AMP a adenosina é realizada pela enzima ecto-5'nucleotidase (E-5'-NT), também denominada CD73, já a desaminação hidrolítica da adenosina à inosina ocorre a partir da enzima adenosina desaminase (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ZIMMERMANN, 1996).

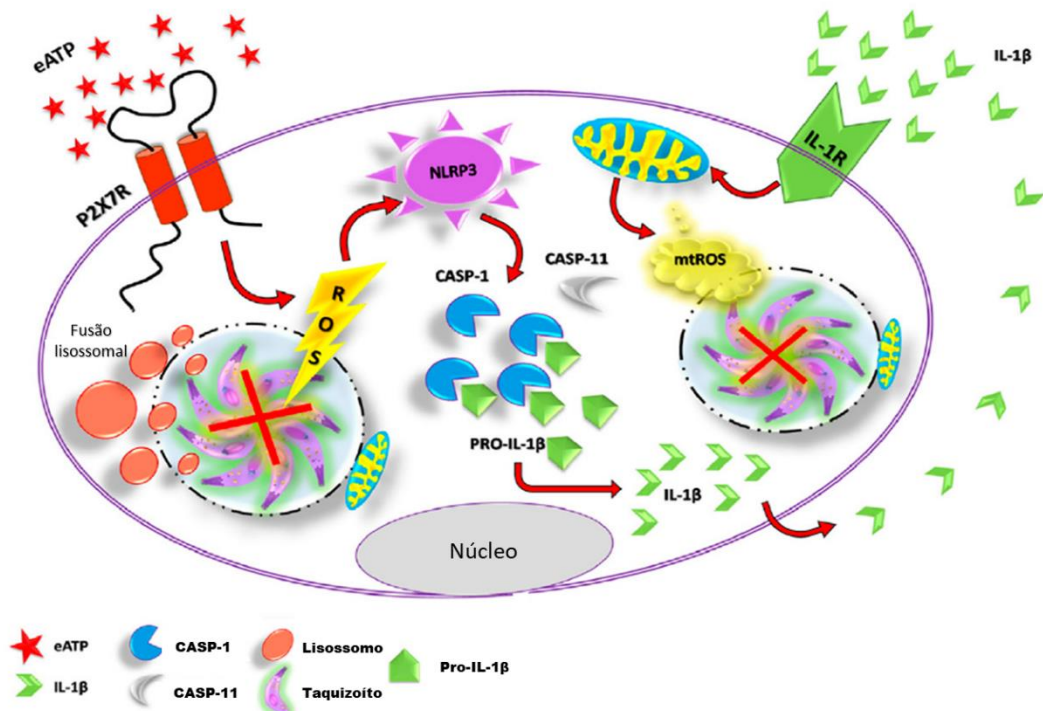
1.3.1 Sistema purinérgico e toxoplasmose

O sistema purinérgico está envolvido em muitos processos patológicos, na toxoplasmose sua participação inicia quando o parasito invade o intestino, essa ação envolve a liberação de ATP para o meio extracelular, nucleotídeo componente da sinalização purinérgica que indica dano celular, e liga-se ao receptor P2X7 na membrana plasmática das células epiteliais intestinais (COUTINHO-SILVA et al., 2009; COUTINHO-SILVA; SAVIO, 2021; MOREIRA-SOUZA et al., 2017). Esse ato,

na fase aguda da doença desempenha um papel importante no desencadeamento de resposta do sistema imune para enfrentar o parasito, uma vez que a ativação do P2X7 pelo ATP, em células epiteliais intestinais infectadas, promove o recrutamento de componentes de defesa do organismo, dentre eles, macrófagos e células dendríticas (HUANG et al., 2017; MILLER et al., 2015; QUAN et al., 2018). Apesar dessas células imunes participarem da defesa do organismo contra o *T. gondii*, são os principais alvos de invasão do parasito, na tentativa de cronificação da doença.

Estudos destacam a participação do sistema purinérgico influenciando na apoptose do parasita em macrófagos e micróglia infectados (CORRÊA et al., 2010, 2017; COSTA-JUNIOR et al., 2011; COUTINHO-SILVA et al., 2009; MOREIRA-SOUZA et al., 2017). Os mecanismos microbicidas que eliminam o parasito ocorrem primeiramente através da ligação do ATP extracelular (eATP) ao receptor purinérgico P2X7, que consegue ativar lisossomos celulares, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ativando inflamassoma NLRP3, com a maturação e liberação de IL-1 β para o meio extracelular, pela atividade da caspase 1, que junto com seu receptor promove a geração de EROs mitocondriais para que no final atuem sobre o vacúolo parasitário e eliminem o parasito (Figura 7) (MOREIRA-SOUZA et al., 2017). Somado a isso, o vacúolo parasitário é encontrado em pH neutro, mas com P2X7 ativado, ocorre o deslocamento da fosfolipase D para atuar neste local e recrutar mais lisossomos a fim de acidificar o pH do vacúolo e degradar o parasito através dos fagolisossomos, este é mais um mecanismo demonstrando que a via purinérgica também é capaz de modular lipídeos para eliminação do agente agressor (COSTA-JUNIOR et al., 2011; COUTINHO-SILVA et al., 2009).

Figura 7 - Mecanismos microbicidas para controle da infecção por *T. gondii* em macrófagos.



Fonte: Adaptado de Moreira-Souza et al. (2017). Abreviações estão na lista de abreviaturas e siglas.

Muitos modelos de estudo confirmam que na deficiência do receptor P2X7 há dificuldade de eliminação do parasito e uma alta suscetibilidade de progressão da doença, devido má resposta imunológica, dessa forma, P2X7 age desencadeando respostas contra o *T. gondii* e protegendo o organismo do mesmo (CORRÊA et al., 2017; HUANG et al., 2017; LEES et al., 2010; MILLER et al., 2015; MOREIRA-SOUZA et al., 2019; QUAN et al., 2018). Por exemplo, na toxoplasmose cerebral, camundongos knockout (P2rx7^{-/-}) apresentaram deficiência na resposta imune, bem como aumento de dano cerebral e persistência do parasito nesse tecido (MOREIRA-SOUZA et al., 2019).

Outros componentes do sistema purinérgico, como a enzima conversora de AMP em adenosina, a CD73, responsável por regular a resposta imune e prevenir dano celular por eventual resposta imune excessiva, desempenha papel contrário na fase aguda e crônica da toxoplasmose. A análise do exsudato peritoneal de camundongos infectados e deficientes desta enzima, revelou um aumento de infiltrados inflamatórios, destacando o papel imunoprotetor de CD73 (MAHAMED; TOUSSAINT; BYNOE, 2015). No entanto, sua presença no cérebro de camundongos

contribuiu para a persistência do parasito, pela diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos, formando o cisto cerebral (MAHAMED et al., 2012).

Nosso grupo de pesquisa também vem estudando a ação do *T. gondii* na sinalização purinérgica em cultura de CPN. As células do telencéfalo de embriões de camundongos infectados congenitamente com a cepa VEG do parasito apresentaram diminuição na hidrólise de ATP e adenosina, com aumento na concentração de P2X7 e elevados níveis de mediadores inflamatórios e também o aumento de A2A responsável pela neuroinflamação (BOTTARI et al., 2019b). Somado a isso, Bottari et al., (2020) analisando córtex de animais infectados observaram redução de adenosina desaminase, comprovando que o parasito utiliza-se da adenosina para persistência e encistamento no SNC. Ainda, o aumento na concentração dos receptores purinérgicos P2X7, P2Y1 e A1 foram relatados neste estudo para a geração de resposta imune adequada e mecanismo preventivo de dano celular frente a excessiva resposta imune.

1.3.2 Sistema purinérgico na neurogênese

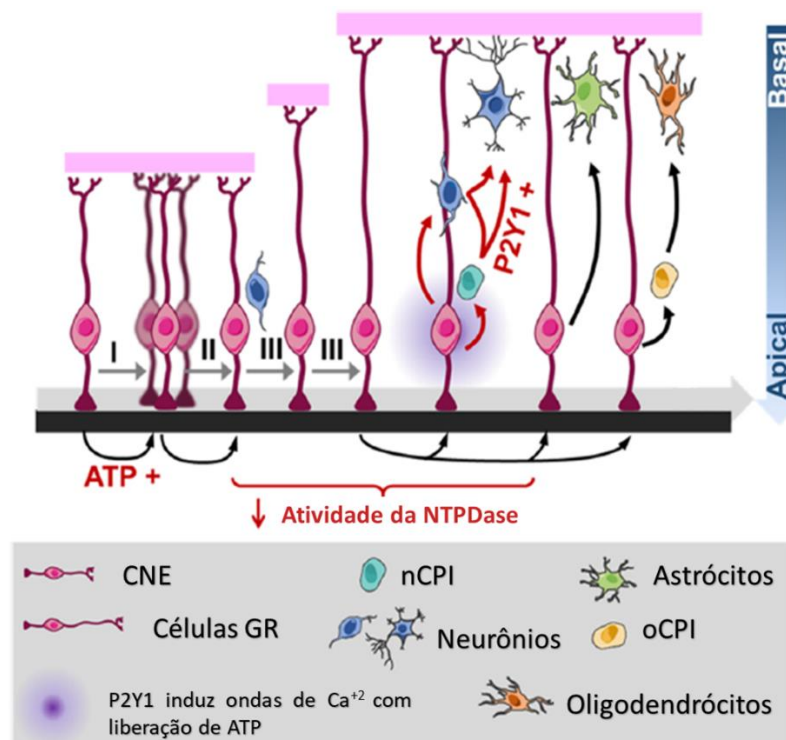
Durante a formação do SNC embrionário, bem como na neurogênese embrionária e adulta há a presença de componentes do sistema purinérgico regulando este processo. Apesar dos poucos estudos nesta área, nucleotídeos, receptores e enzimas desempenham papéis na proliferação celular, crescimento, diferenciação e apoptose durante a neurogênese, sendo que alterações na sinalização purinérgica comprometem seu desenvolvimento normal (BURNSTOCK; ULRICH, 2011; ZIMMERMANN, 2006, 2011).

Os nucleotídeos, ATP e UTP conseguem ativar receptores purinérgicos do tipo P2, mobilizando fatores de crescimento celular, como EGF e FGF-2. Receptores P2Y acoplam-se a integrinas induzindo ativação de vias de sinalização de proteínas quinases, como a cascata de fosfatidilinositol-3 quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT quinase), proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) e proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) envolvidas no controle entre proliferação, diferenciação, crescimento e apoptose celular (NEARY; ZIMMERMANN, 2009; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; ZIMMERMANN, 2006, 2011). Durante a neurogênese embrionária o principal receptor envolvido na proliferação e diferenciação celular é o P2Y1, que promove o aumento de cálcio intracelular, essencial também para que este processo ocorra normalmente (BURNSTOCK;

ULRICH, 2011; DEL PUERTO; WANDOSELL; GARRIDO, 2013; NEARY; ZIMMERMANN, 2009; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018).

A figura 8, esquematiza o papel do sistema purinérgico na neurogênese embrionária. CNE sofrem mitose para gerar novas CNEs ou neurônios imaturos, esse processo é mediado pelo ATP. CNEs alongam-se gerando células GR, podendo se dividir para formar os neurônios ou nCPI, mecanismo desencadeado pela ligação do ATP ao P2Y1, ativando-o. Esse receptor, como descrito anteriormente, provoca liberação de cálcio intracelular, resultando na liberação de ATP e estimulando diferenciação de nCPI. Nessa etapa, a atividade da enzima E-NTPDase é diminuída para evitar a degradação do nucleotídeo. Células RG também podem transformar-se em astrócitos ou oCPIs e posteriormente em oligodendrócitos (RIBEIRO et al., 2019).

Figura 8 – Sinalização purinérgica na neurogênese embrionária.



Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2019). Abreviações estão na lista de abreviaturas e siglas.

Com isso, o ATP desempenha um papel relevante na neurogênese embrionária via ativação de P2Y1, mas outros receptores são descritos nesse tópico, como os receptores P2Y2 e P2X4 que atuam na proliferação e indução neural. Durante a diferenciação celular é vista a atuação de P2X2, P2X6, P2Y2 e P2Y6 aumentados. O também aumento de receptores P2X3, P2X4, P2Y1, P2Y4 em células embrionárias, é seguida de diminuição da atividade com o passar de sua diferenciação. Além do

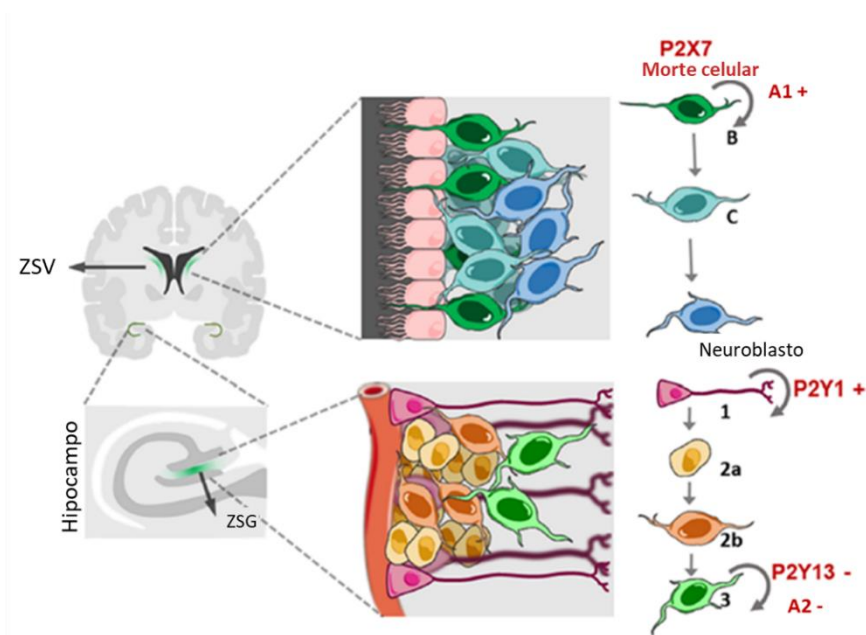
mais o receptor P2X7, em cultivo de células tronco embrionárias de camundongos, atuou positivamente para proliferação e negativamente após diferenciação, agindo como regulador da apoptose durante a embriogênese (GLASER et al., 2014; LIN et al., 2008).

A exposição de células tronco neurais adultas e CPN aos antagonistas de receptores P2 inibem a proliferação celular, indicando que o bloqueio de receptores impedem os efeito do ATP, interferindo na proliferação, diferenciação e migração celular (LIN et al., 2008; MISHRA et al., 2006).

A sinalização purinérgica também participa e regula a neurogênese adulta. O ATP expressa receptores que levam a respostas proliferativas e com a participação de fatores de crescimento, o nucleotídeo também desempenha papel relevante na migração de células tronco neurais em murinos adultos (GRIMM; ULLSPERGER; ZIMMERMANN, 2010). A proliferação celular é desencadeada por expressão de P2Y1 e A2A, sendo que ativação de P2Y13 e P2X7 prejudica o processo. A concentração de ATP novamente é regulada pela enzima NTPDase 2 continuando com sua expressão na neurogênese adulta (RIBEIRO et al., 2019).

Na ZSV há a presença de células tronco neurais (células B), derivadas de células GR que proliferaram. A ativação de P2X7 induz apoptose e a estimulação de receptor A1, pela adenosina, promove proliferação através da via MEK/ERK e Akt (MIGITA et al., 2008), atuando como reguladores da quantidade celular. Assim, células B diferem-se em células C (estado proliferativo), com posterior origem aos neuroblastos. No hipocampo, as células da glia radial 1 sofrem proliferação por ativação de receptor P2Y1, ao qual se diferenciam no processo final em neuroblastos (células 3). Adenosina é responsável pela ativação de receptores do tipo A2 nessas células a fim de inibir proliferação, assim como P2Y13 na inibição da gliogênese e neurogênese (Figura 9) (DEL PUERTO; WANDOSELL; GARRIDO, 2013; RIBEIRO et al., 2019).

Figura 9 – Componentes da sinalização purinérgica que atuam na neurogênese adulta.



Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2019).

A partir da compreensão e importância do envolvimento de componentes purinérgicos no processo fisiológico da neurogênese, bem como a grave interferência do *T. gondii* na neurogênese e também na sinalização purinérgica, torna-se relevante investigar alvos terapêuticos capazes de agir contra esse parasita.

1.4 CURCUMINA

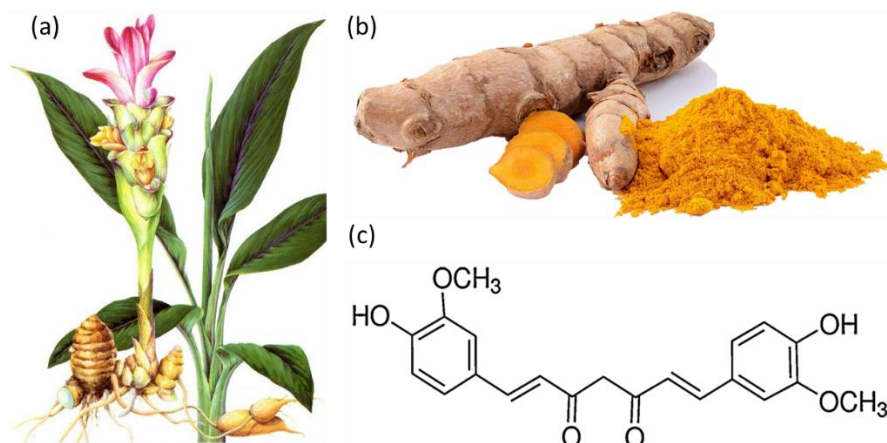
Produtos de origem vegetal estão cada vez mais sendo investigados para o tratamento de doenças emergentes devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, uma vez que tratamentos convencionais tornam-se ineficazes e prejudiciais aos pacientes já debilitados, além da diversidade patogênica, peculiaridade de cada organismo acometido e o uso de fármacos como finalidade paliativa (GONZÁLEZ-PONCE et al., 2018). Estudos sugerem que o mecanismo de ação de produtos naturais está frequentemente relacionado às capacidades antioxidante e anti-inflamatória (BOEING et al., 2012).

Devido a potencial gravidade das manifestações clínicas da neurotoxoplasmose especialmente em imunocomprometidos, gestantes e neonatos (BRASIL, 2018), assim como a toxicidade ocasionada pelos fármacos disponíveis (PORTER; SANDE, 1992) e considerando que os medicamentos utilizados na prática clínica são exclusivamente ativos contra o estágio de taquizoítos (fase aguda), não

demonstrando atividade contra cistos teciduais (estágio latente, fase crônica) (DUNAY et al., 2018), se faz necessário a busca por novos compostos ativos capazes de minimizar os efeitos colaterais e de combate ao parasito.

Diante disso, destaca-se a *Curcuma longa* (*C. longa*) (Figura 10a), uma planta pertencente à família *Zingiberaceae*, nativa do sudeste da Ásia, conhecida popularmente no Brasil como “açafrão da Índia”, “açafrão da terra”, “açafrão”, “cúrcuma” e “gengibre amarelo” (AGGARWAL et al., 2007; AYATI et al., 2019). Suas raízes (Figura 10b) possuem atividade medicinal que há muito tempo tem sido utilizadas para tratar doenças do fígado e pele, câncer, asma e inflamações (AYATI et al., 2019; TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019). Os componentes químicos da cúrcuma são basicamente fenólicos, óleos essenciais, esteroides e alcaloides (MAITI; DUNBAR, 2018). Os compostos curcuminóides (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) são polifenóis responsáveis pela coloração amarela avermelhada da raiz, sendo a curcumina (Figura 10c) (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona), o polifenol presente em maior concentração nas raízes desta planta e descrita por possuir propriedades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, possibilitando o tratamento de muitas doenças emergentes (AYATI et al., 2019; AZAMI et al., 2018; BERESWILL et al., 2010; CHERAGHIPOUR et al., 2018; SERPA GUERRA et al., 2020).

Figura 10 – Planta *Curcuma longa* (a), Raízes e pó das raízes de *Curcuma longa* (b) e Estrutura química da curcumina (c).



Fonte: Adaptado de Zheng et al. (2018) e Zhang et al. (2019).

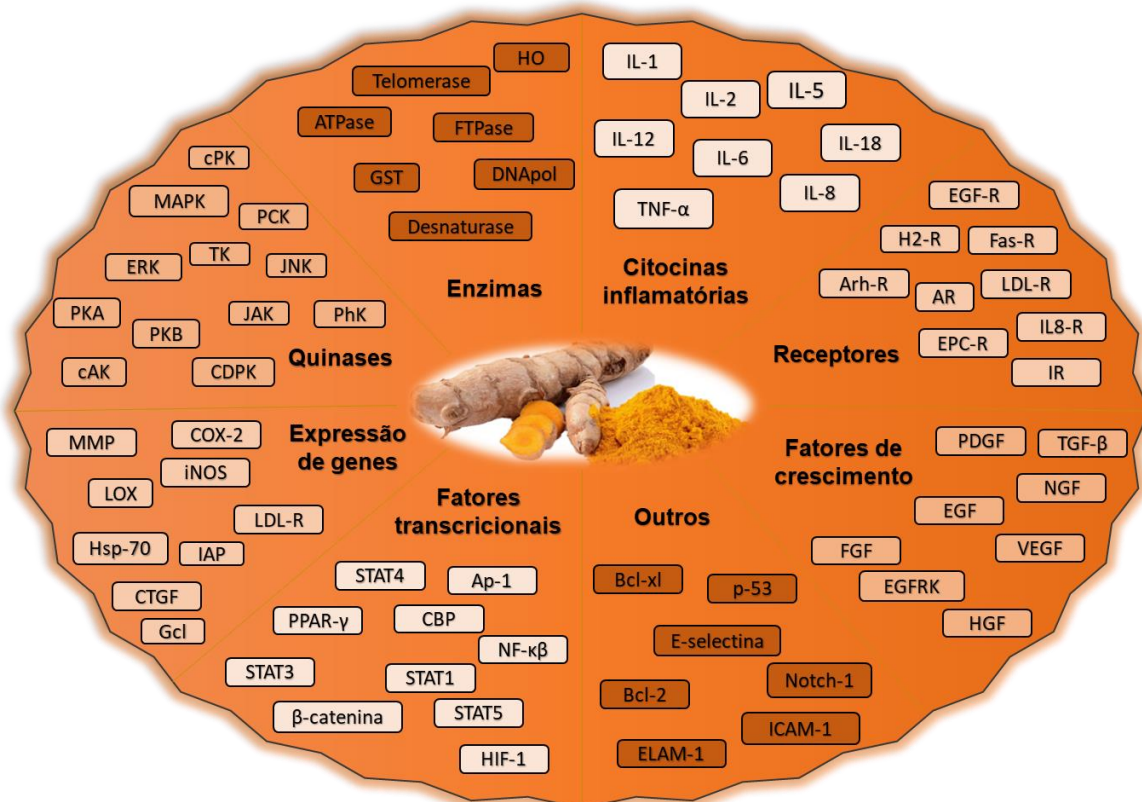
Suas características químicas, presença dos grupos metoxi, hidroxil, α , β -carbonil insaturado ou grupos dicetona, permitem que possua a capacidade de

modular várias vias de sinalização celular e alvos moleculares, garantindo seu vasto uso terapêutico, principalmente para doenças crônicas (DEL PRADO-AUDELO et al., 2019; LICZBIŃSKI; MICHAŁOWICZ; BUKOWSKA, 2020; MAITI; DUNBAR, 2018; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Tendo em vista sua ação antioxidante, relata-se que este polifenol tem a capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, estabilizando espécies reativas geradas, impedindo suas ações celulares danosas. Também é capaz de quelar íons metálicos, como ferro, cobre e zinco, principais geradores de radicais livres (GUPTA; PATCHVA; AGGARWAL, 2013; LICZBIŃSKI; MICHAŁOWICZ; BUKOWSKA, 2020).

A curcumina é capaz de atuar no Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), controlando a transcrição do DNA, respostas inflamatórias, processos tumorais e algumas infecções parasitárias (AGGARWAL et al., 2007; LICZBIŃSKI; MICHAŁOWICZ; BUKOWSKA, 2020; MAITI; DUNBAR, 2018). O polifenol também age na cascata do ácido araquidônico, bloqueando a 5-lipooxigenase e ciclooxigenase-2, responsável pela produção de eicosanoides, importantes na síntese de mediadores inflamatórios (AGGARWAL et al., 2007; AYATI et al., 2019; BHAT et al., 2019; LICZBIŃSKI; MICHAŁOWICZ; BUKOWSKA, 2020). A via das quinases também é afetada pela curcumina, a inibição das proteínas MAPK e ERK causa a diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias, atenuando a inflamação (AGGARWAL et al., 2007; CAMACHO-BARQUERO et al., 2007; LICZBIŃSKI; MICHAŁOWICZ; BUKOWSKA, 2020). Estes e outros exemplos de alvos moleculares da curcumina, causando modificações na expressão de genes, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, enzimas, receptores etc., estão expostos na figura 11.

Figura 11 – Exemplos de alvos moleculares da curcumina.



Fonte: Adaptado de Aggarwal et al. (2007). Abreviações estão na lista de abreviaturas e siglas.

Apesar de suas amplas características benéficas comprovadas pela literatura científica, a curcumina possui desvantagens, como a baixa biodisponibilidade, devido sua má absorção, metabolismo rápido e eliminação sistêmica rápida, além de ser tóxica em concentrações específicas dependendo do modelo experimental (BHAT et al., 2019; DEL PRADO-AUDELO et al., 2019; LIN et al., 2021; MOREIRA-PINTO et al., 2020; RAKOTOARISOA; ANGELOVA, 2018; SOLEIMANI; SAHEBKAR; HOSSEINZADEH, 2018).

Estudos de triagem clínica em humanos apresentam dados indicando que a curcumina é segura mesmo em altas doses (12 g/dia), mas algumas poucas pesquisas vem apontando caminhos contrários a esse (ANAND et al., 2007). Desde 1992, autores demonstraram o efeito tóxico de extratos etanoicos da rizomas da *C. longa* em modelo de camundongos (QURESHI; SHAH; AGEEL, 1992).

Um estudo de revisão da literatura identificou a toxicidade de 200 compostos químicos de açafrão, sendo que a curcumina e derivados podem causar hepatotoxicidade dependente da dose (BALAJI; CHEMPAKAM, 2010). O consumo de

500-1000 mg/kg de curcumina diária durante 28 dias por camundongos *Swiss* fêmeas gerou alterações em marcadores de dano hepático e estresse oxidativo. Na mesma pesquisa, os autores demonstraram que o consumo do polifenol nas mesmas doses e tempo provocaram interferência na fertilidade, verificando o efeito da curcumina como um contraceptivo (SANTOS, 2019).

Células da granulosa de humanos tratadas com curcumina (0,001-50 μM) revelou que baixas concentrações aumentaram a viabilidade celular e em contraste, altas concentrações de curcumina desencadearam redução pelo teste de MTT e ativação de mecanismos de morte celular programada, além de desregulação na função hormonal desse tipo celular (MOREIRA-PINTO et al., 2020). Corroborando com esses resultados, Lin et al. (2021) relataram que o cultivo de células da granulosa de búfalos tratados com curcumina também desencadeou apoptose celular e autofagia, destacando que a perturbação na via IKK/NF- κB é a responsável pelos seus efeitos tóxicos.

Para solucionar esse problema, o uso da nanotecnologia surge como uma possível opção para controlar a liberação de compostos ativos, reduzindo sua toxicidade e prolongando o efeito terapêutico (DEL PRADO-AUDELO et al., 2019).

Embora a redução de toxicidade de terapêuticos ser bem descrita, para a produção de nanocápsulas são necessários polímeros/tensoativo que devido à suas características permitem que haja a formação do produto em forma nanométrica permitindo sua estabilidade, mas que apresentam também certa toxicidade, como span 60, span 80 e tween 80. Ou seja, dependendo do tipo de polímero escolhido e a composição final da formulação a toxicidade é variável, por exemplo poli- ϵ -caprolactona (PCL) é menos tóxico que Eudragit (EDG) (DEL PRADO-AUDELO et al., 2019; PORTO; ALMEIDA; VICENTINI, 2020; SADEGH MALVAJERD et al., 2019; ZIELIŃSKA et al., 2020)

Embora haja a desvantagem descrita anteriormente, por conta de seu tamanho nanométrico, as nanoformulações podem ser utilizadas como sistemas de entrega de compostos ativos no local de ação desejado, principalmente permitindo ultrapassar a BHE, sendo uma promessa para terapias de doenças que acometem o SNC (BHAT et al., 2019; DEL PRADO-AUDELO et al., 2019; RAKOTOARISOA; ANGELOVA, 2018).

Muitos estudos relatam que o uso da curcumina livre ou nanoestruturada é benéfica para tratar injúrias no cérebro, doenças neurodegenerativas e psiquiátricas

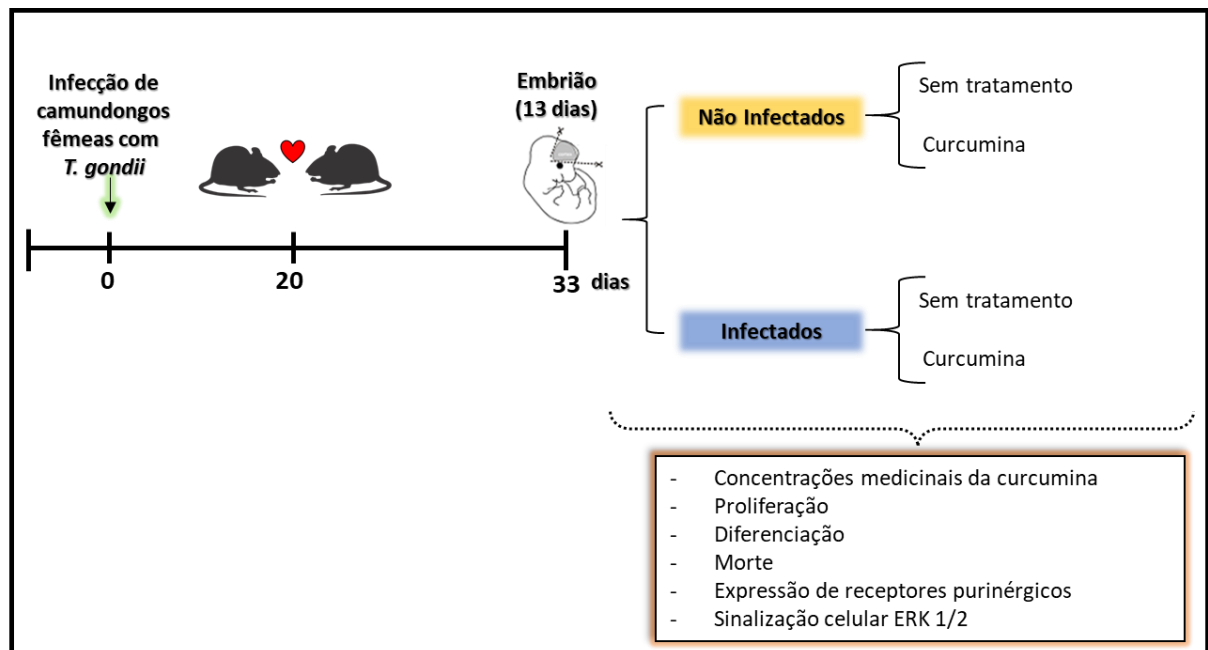
(BAGHERI et al., 2020; BHAT et al., 2019; DA COSTA et al., 2018; DEL PRADO-AUDELO et al., 2019; FAN et al., 2019; TIWARI et al., 2014; WANG et al., 2020; WEI et al., 2021; XIANG et al., 2020). Um estudo de neurotoxicidade hipocampal induzido por deltametrina em ratos revelou que a curcumina e nanocurcumina apresentaram potencial neuroprotetor por sua característica antioxidante (Zaki et al., 2020). A neurogênese hipocampal de camundongos *Swiss* foi alvo de estudo de Namgyal e colaboradores (2020), seus resultados afirmam que a curcumina conseguiu reverter o efeito da neurotoxicidade induzida por cádmio além de restabelecer a neurogênese hipocampal.

A curcumina também tem sido alvo de estudo, com resultados positivos, para o tratamento de doenças parasitárias, como leishmaniose (ELAMIN et al., 2021; JASIM, 2020), giardíase (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ et al., 2017; SAID; ELSAMAD; GOHAR, 2012), esquistossomose (MORAIS et al., 2013) e malária (COMA-CROS et al., 2018; DENDE et al., 2015). Algumas pesquisas também revelam que o polifenol é potente para combater os danos causados pelo *T. gondii* (AZAMI et al., 2018; GOO et al., 2015; SAKI et al., 2020).

Azami e colaboradores (2018), em modelo animal, realizaram um estudo utilizando a curcumina nanoemulsionada para o tratamento de toxoplasmose na fase aguda e crônica, quando analisado o cérebro dos camundongos infectados e tratados, os resultados foram satisfatórios quanto à redução do tamanho e número de cistos teciduais, quando comparado ao grupo infectado que não recebeu tratamento. A curcumina também conseguiu inibir a atividade da glioxilase do *T. gondii* e a propagação do parasito *in vitro* (GOO et al., 2015).

Tendo como base os estudos referenciados anteriormente, onde a curcumina possui potencial antiparasitário para o *T. gondii*, e amplamente utilizado para o tratamento de doenças que envolvem o SNC, bem como sabendo da ocorrência de alterações na neurogênese de camundongos adultos e embriões infectados experimentalmente com este parasito, propomos o modelo de estudo com CPN (na neurogênese embrionária - *in vitro*) já consolidado em nosso grupo de pesquisa (Figura 12) (BOTTARI et al., 2019b, 2019a, 2020; FRACASSO et al., 2019; REICHERT et al., 2019).

Figura 12 – Delineamento experimental da toxoplasmose congênita e neurogênese *in vitro*.



Avaliou-se os efeitos da curcumina *in vitro* na neurogênese e sistema purinérgico em CPN oriundas do telencéfalo de camundongos infectados congenitamente e não infectados com *T. gondii*.

Fonte: Autora.

Portanto, considerando a problemática anteriormente descrita para o parasito *T. gondii* no organismo e as ações benéficas da curcumina para tratar doenças cerebrais e a toxoplasmose, sugere-se a utilização desse polifenol de origem natural, a fim de minimizar as alterações na neurogênese embrionária causada pelo *T. gondii*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da curcumina e de duas nanocápsulas de curcumina utilizando cultivo de células neurais, além de investigar a ação da curcumina na sinalização purinérgica e na neurogênese de CPNs obtidas do telencéfalo de embriões oriundos de camundongos infectados e não infectados com *T. gondii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar concentrações não tóxicas da curcumina e de duas nanocápsulas de curcumina utilizando as linhagens celulares BV-2 (micróglia) e SH-SY5Y (*neuronal-like cells*) a partir da viabilidade celular, conteúdo de DNA extracelular, níveis de EROs e óxido nítrico (ON);

- Investigar a ação da curcumina na proliferação, diferenciação e morte de CPNs obtidas do telencéfalo de embriões infectados com *T. gondii*;

- Analisar a expressão de receptores purinérgicos (A₁, A_{2A} e P2X₇) em CPNs do telencéfalo de embriões infectados com *T. gondii* e após o tratamento com a curcumina;

- Analisar o efeito da curcumina na via de sinalização celular ERK1/2 em CPNs infectadas com *T. gondii*.

3 MÉTODOS E RESULTADOS

A metodologia e os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados na forma de um artigo e um manuscrito a seguir. Os itens “Materiais e Métodos” e “Resultados” encontram-se descritos nos respectivos tópicos.

3.1 ARTIGO

O artigo está publicado na revista **Drug and Chemical Toxicology**.

ISSN: 0148-0545

Fator de impacto 3.356 (2020) – Qualis B2 (área CBII).

Título: *Impact of free curcumin and curcumin nanocapsules on viability and oxidative status of neural cell lines.*

DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.2015242>



IMPACT OF FREE CURCUMIN AND CURCUMIN NANOCAPSULES ON VIABILITY AND OXIDATIVE STATUS OF NEURAL CELL LINES

Bianca Fagan Bissacotti^{1*}, Priscila Marquezan Copetti^{1*}, Nathieli Bianchin Bottari¹, Samanta da Silva Gündel², Alencar Kolinski Machado², Michele Rorato Sagrillo², Aline Ferreira Ourique², Vera Maria Melchior Morsch¹, Aleksandro Schafer da Silva^{1,3**}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

² Graduate Program in Nanosciences, Franciscan University (UFN), Santa Maria, RS, Brazil.

³ Graduate Program of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brazil.

*Bianca Fagan Bissacotti and Priscila Marquezan Copetti are co-first authors and contributed equally to this work.

**B.F.B. and A.S.D.S. are corresponding authors: Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFSM. Avenida Roraima, nº 1000, Camobi District, Zip Code 97105900, Santa Maria, Brazil. E-mail: bianca_fbissacotti@hotmail.com; aleksandro_ss@yahoo.com.br

Abstract

Curcumin is an active polyphenol substance found in the highest concentrations in the roots of *Curcuma longa*. Its health benefits have led to recent increases in the consumption of curcumin. It has anti-inflammatory and antioxidant activities and is a potent neuroprotective against diseases of the brain. Nevertheless, its low bioavailability and its relative difficulty crossing the blood-brain barrier limit curcumin's use for these purposes. Curcumin-loaded nanoparticles may be an effective treatment for several diseases although there is a paucity of studies reporting its safety in the central nervous system (CNS). Therefore, this study aimed to identify non-neurotoxic concentrations of free curcumin and two nanoformulations of curcumin. Cell lines BV-2 and SH-SY5Y, both originating from the CNS, were evaluated after 24, 48, and 72 h of treatment with free curcumin and nanocapsules. We measured viability, proliferation and dsDNA levels. We measured levels of reactive oxygen species and nitric oxide as proxies for oxidative stress in culture supernatants. We found that free curcumin was toxic at 10 and 20 μM , principally at 72 h. Nanoformulations were more neurotoxic than the free form. Safe concentrations of free curcumin are between 1-5 μM , and these concentrations were lower for nanoformulations. We determined the ideal concentrations of free curcumin and nanocapsules serving as a basis for studies of injuries that affect the CNS.

Keywords Curcumin. Microglia. Nanocapsules. Neurons. Safety.

1. Introduction

Natural products are increasingly studied for the treatment of diseases. Curcumin is the primary active compound present in the roots of the *Curcuma longa* plant. This polyphenol has as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, and anticarcinogenic properties (Ayati *et al.* 2019, Khazdair *et al.* 2019, Tomeh *et al.* 2019, Willenbacher *et al.* 2019).

Curcumin may prevent or treat diseases characterized by inflammation or oxidative stress; it scavenges reactive oxygen species (ROS) chelates metal ions, and inhibits the mitogen-activating protein kinases pathway (Camacho-Barquero *et al.* 2007, Hewlings and Kalman 2017, Ayati *et al.* 2019).

Many reviews discussed the use of curcumin to treat diseases of the central nervous system (CNS), including Parkinson's, Alzheimer's, Huntington's disease, and multiple sclerosis (da Costa *et al.* 2018, Maiti and Dunbar 2018, Bhat *et al.* 2019, Khazdair *et al.* 2019, Bagheri *et al.* 2020). In an *in vitro* experimental model of neurodegenerative disease, Armagan and Naziroglu (Armağan and Naziroğlu 2020) reported the neuroprotective action of curcumin by modulating oxidative stress. In addition, this polyphenol is capable to decrease neurotoxicity, which is proven by other models of neurological disorders *in vitro* (Fan *et al.* 2019, Armağan and Naziroğlu 2020, Wang *et al.* 2020, Xiang *et al.* 2020, Wei *et al.* 2021) and *in vivo* studies (Khan *et al.* 2019, Namgyal *et al.* 2020).

Despite its substantial benefits, curcumin is toxic in high doses, at which it becomes an oxidant. The use of curcumin is also limited by low bioavailability, that results from its rapid metabolism and elimination (Ahmed *et al.* 2012, Rakotoarisoa and Angelova 2018, Del Prado-Audelo *et al.* 2019, Vaiserman *et al.* 2020). Nanotechnology might overcome these limitations.

Pharmaceutical nanotechnology has been assisting researchers in developing pharmacological investigations, because nanostructures control the release of the active compound, consequently reducing toxicity and prolonging the therapeutic effect. Their characteristic size permits nanostructures cross barriers, including the blood-brain barrier, for example, increasing bioavailability at diseased sites (Ahmed *et al.* 2012, Rakotoarisoa and Angelova 2018, Sadegh Malvajerd *et al.* 2019).

Some studies demonstrated curcumin nanoformulations in the treatment of CNS diseases (Azami *et al.* 2018, Mursaleen *et al.* 2020). In a study comparing free

curcumin and its nanostructured form to reverse hippocampal damage in rats, a curcumin nanocomposite was superior to curcumin alone (Zaki *et al.* 2020).

Curcumin and its nanoformulations possess several positive biological activities; however, few studies reported its safe concentrations in normal CNS cells. Such an evaluation is essential to determine safe concentrations of these agents that would permit further study (Qureshi *et al.* 1992, Soleimani *et al.* 2018, Ghasemi *et al.* 2019).

Therefore, the objective of the present study was to determine non-toxic concentrations of free curcumin and two types of nanoformulations containing curcumin using cell lines derived from the CNS.

2. Materials and methods

2.1 Nanocapsules preparation

Nanocapsules were developed using interfacial deposition of the preformed polymer, following the descriptions described by Jaguezeski *et al.* (Jaguezeski *et al.* 2019), with two polymers, poly- ϵ -caprolactone (PCL) (Sigma-Aldrich) or Eudragit L-100 (EDG) (Evonik).

In both formulations, the oil phase was poured into the aqueous phase and stirred for 15 minutes. The organic solvent was evaporated using a rotary evaporator. The PCL nanocapsule (NC-PCL) was developed containing 2 mg/mL of curcumin (Sigma-Aldrich), and the EDG nanocapsule (NC-EDG) was developed containing 0.25 mg/mL. Nanocapsules without curcumin were also prepared (NB-PCL and NB-EDG, respectively) (Jaguezeski *et al.* 2019).

2.2 Nanocapsules characterization

We used the dynamic light scattering technique to determine the mean particle size and polydispersity index (Zetasizer® nano-ZS model ZEN 3600, Malvern). The zeta potential (ZP) was determined using the electrophoretic mobility technique (Zetasizer® nano - ZS model ZEN 3600, Malvern) and pH was determined directly using a potentiometer (DM-22, Digimed®) (Gündel *et al.* 2018).

The curcumin content in the nanocapsules was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). The encapsulation efficiency was determined using ultrafiltration-centrifugation with subsequent HPLC analysis according to the methodology described by Jaguezeski *et al.* (Jaguezeski *et al.* 2019).

2.3 Cell culture

Microglia cells (cell line BV-2) and neuron-like cells (cell line SH-SY5Y) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (ATCC® 0356, RJ, Brazil; ATCC® 0223, RJ, Brazil, respectively). BV-2 were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco® Thermo Fisher) and supplemented with 1% of antibiotic (100U/mL penicillin; 100mg/mL streptomycin) (Gibco® Thermo Fisher). SH-SY5Y cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing F12 supplement (Gibco® Thermo Fisher) with 10% FBS and 1% antibiotic. Cells were cultured at 37°C with 95% oxygen and 5% CO₂ until the numbers of cells were sufficient to perform the experimental treatments and analyses.

2.4 Treatments

BV-2 and SH-SY5Y cells were seeded in 96-well plates at 2.5×10^5 cells/mL. The neurotoxicities of free curcumin, NC-EDG, and NC-PCL were tested using a concentration-response curve (0.01 – 20 μ M) applied to both line cells at 24, 48, 72 h of exposure. For positive control, we used 25 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂) and negative control (CTL) only cells. We also used 1% ethanol as a control because curcumin was first diluted in this solvent. After the periods of incubation, cells were subjected to colorimetric and fluorometric assays.

2.5 Mitochondrial viability

Mitochondrial viability was measured using the MTT assay to measure cell viability or proliferative status. Cells were incubated with MTT reagent (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) at 5 mg/mL for up to 2 h. Then, dimethylsulphoxide (Sigma-Aldrich) was added, and the absorbance was determined at 560 nm (Fukui *et al.* 2010).

2.6 Extracellular double-strand DNA quantification

Quantification of extracellular-double-strand DNA (dsDNA) was performed in the cellular supernatants using the Quant-IT PicoGreen® dsDNA kit (Thermo Fischer). The reagent was added to each sample for 5 minutes at room temperature, avoiding light exposure. Emitted fluorescence was measured at 480 nm of excitation and 520 nm of emission (Ahn *et al.* 1996).

2.7 Reactive oxygen species levels

The quantification of ROS production was conducted in supernatants using 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) reagent (Sigma-Aldrich). Fluorescence reading was performed at excitation of 485 nm and emission 520 nm after 1-hour incubation with the reagent at room temperature and under light protection (Costa *et al.* 2012).

2.8 Nitric oxide levels

The determination of NO present in the culture supernatant was based on an indirect measurement protocol published by Choi *et al.*, which uses Griess reagent to detect organic nitrite. The absorbance was determined at 560 nm (Choi *et al.* 2012).

2.9 Statistical analysis

The results were transformed to percentages for the negative control group. Statistical differences between groups were analyzed using one-way ANOVA, followed by the Tukey test, using GraphPad Prism 8 software. The data were presented as mean \pm SEM. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Nanocapsules characterization

The NC-PCL and NB-PCL formulations showed particle sizes of 194 ± 0.31 nm and 188 ± 1.10 nm, respectively. NC-EDG measured 168 ± 1.96 nm, and NB-EDG were 169 ± 1.08 nm in size. All formulations showed a polydispersion index of 0.1, indicating size uniformity. The nanocapsules gave negative ZP and acidic pH, characteristics of their constituents (NC-PCL: -8.16 ± 0.53 mV; 6.23 ± 0.02 , NB-PCL: -7.25 ± 0.67 mV; 6.35 ± 0.03 , NC-EDG: -17.00 ± 1.04 mV; 4.35 ± 0.02 , NB-EDG: -17.53 ± 1.30 mV; 4.33 ± 0.02 , respectively). The encapsulation efficiency of the nanoformulations was 100% in all cases, with curcumin concentrations of 0.25 mg/ml for NC-EDG and 2 mg/ml for NC-PCL (Supplemental Table 1).

3.2 Curcumin treatments decrease or increase viability depending on the exposure time

To determine the viability of BV-2 cells against exposure of treatments with free and nanoencapsulated curcumin, the MTT assay demonstrated, that 20 μ M of NB-EDG decreased microglial viability at 24 h, as did 0.01 and 20 μ M NC-EDG. Treatment

with NB-PCL showed no statistically significant difference; however, but 0.05, 0.5, and 1.0 μM of NC-PCL stimulated proliferation (Fig. 1a).

After 48 h of exposure to treatments, only 20 μM of NB-EDG increased cell viability (Fig. 1b). At 72 h, the three lowest concentrations of NB-EDG and NC-EDG (0.01, 0.05, and 0.1 μM) decreased cell viability in BV-2 cells (Fig. 1c). By contrast, from 2.5 μM to 20 μM , NC-EDG increased cell viability (Fig. 1c). Free curcumin showed no differences with the control group (Fig. 1a, 1b, and 1c).

SH-SY5Y cells are a subclone of neurons originating from human neuroblastoma. This cellular line is widely used for *in vitro* models of neural injuries, verifying the neurotoxicity of compounds and neuroprotection (Armağan and Naziroğlu 2020, Mursaleen *et al.* 2020, Xiang *et al.* 2020).

The analysis of neuronal viability, over 24 h of exposure showed that 0.5, 1.0, 2.5, and 5 μM , as well as 2.5 and 5.0 μM of NB-EDG and NC-EDG, respectively, induced neuronal cell proliferation. On the contrary, was found in 0.01 μM of NB-PCL (Fig. 1d).

At 48 h, only 20 μM of free curcumin reduced cell viability (Fig. 1e). When neuronal-like cells were incubated for 72 h, 0.5 and 1.0 μM NC-EDG increased cell viability (Fig. 1f).

3.3 Curcumin nanocapsules induce membrane damage and DNA exposure

Impacts of curcumin on BV-2 and SH-SY5Y cells were determined at 24, 48 and, 72 h. Measurements of free dsDNA in the supernatants of BV-2 and SH-SY5Y cells are presented in Figure 2. In BV-2 cells, 0.01, 0.05, and 0.1 μM of NB-EDG and NC-EDG were associated with less dsDNA at 24 h, whereas the opposite occurred at the two highest concentrations (10 and 20 μM). At 0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 μM , NC-PCL caused membrane damage, exposing the DNA in the supernatants (Fig. 2a).

At 48 h, dsDNA content was lower than CTL, when 0.01, 0.05, and 0.1 μM of NB-EDG and NC-EDG were used in BV-2 cells. A considerable increase of free dsDNA in supernatants was observed when 2.5 until 20 μM of NB-EDG and NC-EDG were added into the cell medium. The same occurred with 0.01, 0.05, 0.1 and 1.0 μM of NC-PCL. The free curcumin treatment was associated with a slight increase in free dsDNA at 1.0 and 2.5 μM after exposure to BV-2 cells (Fig. 2b).

At 72 h after free curcumin or nanocapsules treatment of BV-2 cells, the dsDNA content in the supernatant showed increases for all nanoformulations (Fig. 2c). No significant results of free curcumin were observed in BV-2 cells (Fig. 2c).

The amount of free dsDNA in the supernatants of neuronal-like cells increased in a concentration-dependent manner for EDG nanoformulations. Concentrations of 0.1, 0.5, 10, and 20 μM of NC-PCL also increased levels of dsDNA at 24 h (Fig. 2d). At 48 h after exposure, the same occurred for nanoformulations with EDG. Nanocapsules with PCL also increased dsDNA content for all concentrations (Fig. 2e). At longer exposure times, dsDNA levels supernatants significantly increased with treatment of 20 μM free curcumin, 1.0 to 20 μM of NB-EDG, 0.5 μM of NC-EDG and all concentrations of PCL nanocapsules (Fig. 2f).

3.4 Curcumin nanocapsules modulated NO release in BV-2 and SH-SY5Y cells

The BV-2 cell line originates from the microglia of C57BL/6 mouse brain tissue. We were used these cells because of their phagocytosis activity and involvement in neuroinflammation in brain (Ghasemi *et al.* 2019). To measure the effects of free curcumin and nanocapsules as a NO modulator, nitrite/nitrate levels were measured (Figure 3).

The highest concentration of both curcumin nanocapsules (20 μM) increased levels of NO in BV-2 cells at 24 h (Fig. 3a). After 48 and 72 h, only nanocapsules with EDG maintained the increase (Fig. 3b and 3c). In neuronal-like cells, NO levels were significantly increased in the 20 μM treatments of NB-EDG and NC-EDG at all exposure times (Fig. 3d, 3e, and 3f).

3.5 Modulatory effects of curcumin nanocapsules on ROS levels

Several studies reported anti-oxidant effects of curcumin. Here, we sought to determine the optimal concentration to avoid ROS generation in BV2 and SH-SY5Y cells. We found lower ROS levels 24 h after application of free curcumin (10 and 20 μM), NB-EDG (0.01 up to 5.0 μM), NC-EDG (0.01 up to 20 μM), NB-PCL (0.01, 0.05, 0.5, 1.0 and 5.0 μM), and NC-PCL (0.01 μM and 0.5 up to 20 μM) in BV-2 cells than in CTL (Fig. 4a).

At 48 h after nanocapsules treatments, ROS levels increased when NB-EDG (10 and 20 μM), NB-PLC (1.0, 2.5, and 20 μM), or NC-PCL (0.05 and 0.1 μM) were used when compared to CTL (Fig. 4b). In contrast, high-concentration free curcumin (20 μM) gave lower ROS levels than CTL in BV-2 cells (Fig. 4b).

At the end of the experiment, the addition of free curcumin (0.05 μM), NB-EDG (0.1, 0.5, 2.5, and 10 μM) gave higher ROS levels than CTL in BV-2 cells (Fig. 4c). By contrast, free curcumin (20 μM), NB-PCL (0.01 up to 10 μM), and NC-PCL (0.01 up to 20 μM) significantly diminished ROS levels in BV-2 cell compared to the CTL (Fig. 4c).

In SH-SY5Y cell, ROS production also increased for all nanocapsule preparations; curcumin groups showed no significant changes after 24 h (Fig. 4d). Our results demonstrate decreased ROS levels according to the concentration of NC-EDG (from 1.0 μM). The same happened when the cells were exposed to NC-PCL for 48 h. From 5 μM of curcumin, ROS levels also decreased (Fig. 4e). The two curcumin nanoformulations decreased ROS production from the 2.5 μM concentration and 10 and 20 μM of free curcumin; however, only 0.01 μM of free curcumin was associated with increased ROS production (Fig. 4f).

4. Discussion

Screening of natural compounds is critically important, because they are increasingly used to prevent morbidities without proper monitoring (Parasuraman 2011). In particular, curcumin has many beneficial effects; however, its low bioavailability and rapid metabolism suggest the need for nanoformulations (Umerska *et al.* 2018, Del Prado-Audelo *et al.* 2019).

In the present study, two curcumin nanoformulations were prepared, NC-EDG and NC-PCL. We also prepared two nanoformulations without curcumin to serve as controls. The physio-chemical characteristics of both curcumin nanocapsules showed an efficiency of encapsulation and uniformity of nanometric size; these results were satisfactory according to the production protocol established by our research group (Gündel *et al.* 2018, Jaguzeski *et al.* 2019). Furthermore, nanoformulations have acid pH, but they are beforehand diluted in the culture medium (pH 7.2-7.4) to be added with the cells, therefore, pH values of the treatments become physiological. Nanoformulations with acid pH, after contact with the culture medium, independent of the type and incubation time, pH values are increased to physiological, not harming the cells and the *in vitro* tests (Gündel *et al.* 2018, 2019, Dalcin *et al.* 2019, Copetti *et al.* 2020). The pH did not influence the results of this research.

Curcumin has been considered a promising approach to the treatment of several brain disorders. We determined cytotoxicity parameters of free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules measured as cell death, proliferation and oxidative

profile. *In vitro* experimental models are useful tools because they provide preliminary profiles of cellular responses and possible damages that could occur, guiding subsequent studies (Eisenbrand *et al.* 2002, Gartlon *et al.* 2006).

A review by Soleimani, Sahebkar, and Hosseinzadeh discussed the safety and toxicity of curcumin in *in vitro* and *in vivo* models, both in animal and human trials (Soleimani *et al.* 2018). According to the authors, curcumin was non-toxic up to specific concentrations, depending on the model studied. Nevertheless, the use of curcumin nanoformulations needs to be explored in more depth. The authors indicated that curcumin is non-mutagenic and safe for pregnant animals; however, this assertion should be tested carefully (Soleimani *et al.* 2018). In agreements, some authors defended the notion that nanoencapsulated medications should be tested for their safety. We evaluated NC-PCL and NC-EDG and free curcumin in microglial and neuronal-like cell lines at different incubation periods.

In BV-2 cells, at 24 h after exposure, we found that free curcumin at the two highest concentrations decreased ROS production and 0.5 - 2.5 μM of NC-EDG and 2.5 and 5 μM for NC-PCL were safe to use *in vitro*, in that they did not compromise cell homeostasis. However, at 48 h of exposure, specific concentrations of the nanoformulations unbalanced the oxidative profile. The amount of free DNA increased, suggesting that the non-toxic concentrations were 0.5 - 1.0 μM for NC-EDG and 2.5 μM for NC-PCL, in this situation. With longer exposure times, the amount of free dsDNA was highly significant for all nanoformulations, suggesting possible membrane damage; this finding can be explained by the interaction of the polymers that make up the nanocapsule with the cell membrane, increasing permeability (Umerska *et al.* 2018, Zielińska *et al.* 2020). By contrast, curcumin alone did not cause membrane damage at 72 h.

Exposure of these agents to neuronal-like cells showed that curcumin nanocapsules were associated with increased ROS levels, suggesting oxidative stress. NC-EDG was associated with high dsDNA levels at all concentrations, suggesting membrane damage, possibly due to EDG interacting with the cell membrane. At 48 h, the amount of free dsDNA also increased. By contrast, from 1.0 μM of nanoformulations, ROS production decreased, suggesting that perhaps the nanocapsules positively modulated oxidative mechanism. Curcumin was safe up to 10 μM ; however, it was associated with ROS levels from 2.5 μM . At 72 h, the changes were more significant, suggesting compromised cellular homeostasis.

The antioxidant properties of curcumin are among the essential features that raise its therapeutic value. Severe oxidative stress is a cause of neural loss in the context of brain disorders (Hewlings and Kalman 2017). The production of ROS and NO, under conditions of homeostasis, occurs as part of cellular physiological metabolism and is essential for the organism to identify and eliminate stressors agent. Decreased ROS levels can be harmful under normal conditions but not during diseases treatment. The mechanisms by which curcumin decrease ROS levels, unbalancing the compromising antioxidant profile, involve its antioxidant activity, which neutralizes ROS formed by cells (Camacho-Barquero *et al.* 2007, Hewlings and Kalman 2017, Ayati *et al.* 2019, Tomeh *et al.* 2019, Liczbiński *et al.* 2020). Studies showed that cancer cells are more susceptible to curcumin than normal cells; curcumin's mechanism of action involves the regulation of ROS production, depending on cell type and experimental conditions (Fujisawa *et al.* 2004, Barzegar and Moosavi-Movahedi 2011, Nakamae *et al.* 2019, Liczbiński *et al.* 2020).

Here, we demonstrated that 10 and 20 μM of curcumin, depending on the exposure time, were harmful to cells, causing lower cell viability. In contrast, intermediate curcumin concentrations showed less neurotoxicity compared to the same concentrations of nanoformulations, as these obtained more significant statistical results when compared with negative control. This can be explained by the fact that nanoformulations have components that generate cytotoxicity, including the surfactant polysorbate 80. This fact also explains decreased or increased cell viability, membrane damage, and imbalance in levels of ROS and NO in nanoformulations that did not contain curcumin, used here as controls (Zielińska *et al.* 2020).

Comparing the two curcumin nanoformulations, NC-PCL showed better results than NC-EDG, indicated by the lower significance levels when compared to negative control; however, the optimal choice for use in subsequent experiments will depend on the investigation experimental design because NC-PCL is more suitable for parenteral administration and NC-EDG is better for the oral route; this is because the constituent polymers differ for each nanocapsule. It is also important to highlight that *in vitro* screening tests are very important; however, results obtained *in vivo* may present different results, due to the consideration of an organism and its metabolism as a whole (Ahmed *et al.* 2012, Umerska *et al.* 2018).

It is important to note that cellular behavior, oxidative status depended on the exposure time. Damage increased over time primarily due to the high levels of free

DNA in the supernatants in BV-2 cells and high levels of NO for 20 μ M of NC-EDG. These characteristics must be considered when formulating the experimental design of a study.

No studies focused on safe concentration-response curves of curcumin in healthy cells originating from the CNS,; few studies are the same in healthy cells from tissue sources (Syng-Ai *et al.* 2004, Bala *et al.* 2006, Kunwar *et al.* 2008, Balaji and Chempakam 2010, Ghasemi *et al.* 2019). However, in animals, the ethanolic extract of the rhizomes of *C. longa*, when administered chronically, changed the weight of the heart and lung (Qureshi *et al.* 1992). Corroborating this, Balaji and Chempakam demonstrated the toxicity of several components of *C. longa*, among them curcumin, with dose-dependent hepatotoxicity (Balaji and Chempakam 2010).

Cancer cell lines have been used to determinate the ideal concentration of curcumin treatment and neural lines for brain injuries *in vitro* models.

In the PC12 cancer cells, curcumin decreased cell viability in a concentration dependent manner (Mendonça *et al.* 2009). Using microglial BV-2 cells, Zhang *et al.* found that curcumin inhibited lipopolysaccharide-induced neuroinflammation at 1, 5, 10, 20, and 40 μ M (Zhang *et al.* 2019). Curcumin also inhibited oxidative stress by decreasing ROS in a model of neurodegenerative disease with SH-SY5Y cells at 1, 2.5, and 5 μ M (Xiang *et al.* 2020). Mursaleen *et al.* used curcumin nanoformulation 5 and 10 μ M to protect the cells against neurotoxicity induced by rotenone in SH-SY5Y cells (Mursaleen *et al.* 2020).

These studies demonstrate that our results for safe concentrations of curcumin are in line with those used to treat diseases that affect the CNS. Therefore, concentrations between 1.0 to 5 μ M are not harmful to healthy cells, but the curcumin concentration and time exposure are factors to induce toxicity, mainly 10 and 20 μ M of curcumin. Nevertheless, because of the disadvantages of the substance in free form, nanoformulations at the same concentrations or even lower than those mentioned may deliver more satisfactory results by controlling the release of curcumin and increasing its bioavailability, in addition to crossing the blood-brain barrier and reaching the sites of brain injuries (Rakotoarisoa and Angelova 2018, Del Prado-Audelo *et al.* 2019, Sadegh Malvajerd *et al.* 2019).

According to our introductory study, that determined the non-neurotoxic concentrations of curcumin nanoformulations and their free form, researchers can use our findings as a basis for choosing the optimal concentrations for their experimental

models. It is essential to use safe concentrations to analyze the pharmacological potential of natural products. Because the present study has basic character, more specific investigations and *in vivo* experimental models must be carried out to test our findings.

5. Conclusion

Curcumin nanoformulations using PCL and EDG in BV-2 and SH-SY5Y cells were more toxic than free curcumin. We suggest that 1.0 - 5 μ M of free curcumin and curcumin nanocapsules may be useful for the treating or preventing diseases that affect the CNS, as they do not cause collateral damage to healthy cells.

Funding

BFB and PMC are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES/PROEX process n° 88887.372278/2019-00 and 88887.372294/2019-00.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

BFB and PMC equally performed the experiments, data analysis, and manuscript draft. SSG and AFS produced and characterized the nanocapsules. AKM, MRS, VMM, NBB, and ASS revised the manuscript and funding reagents. All authors read and approved the publication of this manuscript.

References

- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D.J., and Xiao, H., 2012. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry*, 132 (2), 799–807.
- Ahn, S., Costa, J., and Emanuel, J., 1996. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24 (13), 2623–2625.
- Armağan, H.H. and Nazıroğlu, M., 2020. Curcumin Attenuates Hypoxia-Induced Oxidative Neurotoxicity, Apoptosis, Calcium, and Zinc Ion Influxes in a Neuronal Cell Line: Involvement of TRPM2 Channel. *Neurotoxicity Research*.
- Ayati, Z., Ramezani, M., Amiri, M.S., Moghadam, A.T., Rahimi, H., Abdollahzade, A., Sahebkar, A., and Emami, S.A., 2019. Ethnobotany, Phytochemistry and Traditional Uses of *Curcuma* spp. and Pharmacological Profile of Two Important Species (*C. longa* and *C. zedoaria*): A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 25 (8), 871–935.
- Azami, S.J., Teimouri, A., Keshavarz, H., Amani, A., Esmaeili, F., Hasanpour, H., Elikae, S., Salehiniya, H., and Shojaee, S., 2018. Curcumin nanoemulsion as a novel chemical for the treatment of acute and chronic toxoplasmosis in mice. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 7363–7374.
- Bagheri, H., Ghasemi, F., Barreto, G.E., Rafiee, R., Sathyapalan, T., and Sahebkar, A., 2020. Effects of curcumin on mitochondria in neurodegenerative diseases. *BioFactors*, 46 (1), 5–20.
- Bala, K., Tripathy, B.C., and Sharma, D., 2006. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology*, 7 (2), 81–89.
- Balaji, S. and Chempakam, B., 2010. Toxicity prediction of compounds from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food and Chemical Toxicology*, 48 (10), 2951–2959.
- Barzegar, A. and Moosavi-Movahedi, A.A., 2011. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS ONE*, 6 (10), 1–7.
- Bhat, A., Mahalakshmi, A.M., Ray, B., Tuladhar, S., Hediya, T.A., Manthiannem, E., Padamati, J., Chandra, R., Chidambaram, S.B., and Sakharkar, M.K., 2019. Benefits of curcumin in brain disorders. *BioFactors*, 45 (5), 666–689.
- Camacho-Barquero, L., Villegas, I., Sánchez-Calvo, J.M., Talero, E., Sánchez-Fidalgo, S., Motilva, V., and Alarcón de la Lastra, C., 2007. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *International Immunopharmacology*, 7 (3), 333–342.
- Choi, W., Shin, P., Lee, J., and Kim, G., 2012. The regulatory effect of veratric acid on

- NO production in LPS-stimulated. *Cellular Immunology*, 280 (2), 164–170.
- Copetti, P.M., Gündel, S. da S., de Oliveira, P.S.B., Favarin, F.R., Ramos, A.P., Pintos, F.G., Pappis, L., Gündel, A., Machado, A.K., Ourique, A.F., and Sagrillo, M.R., 2020. Development, characterisation, stability study and antileukemic evaluation of nanoemulsions containing *Astrocaryum aculeatum* extract. *Natural Product Research*, 0 (0), 1–6.
- Costa, F., Dornelles, E., Mânica-Cattani, M.F., Algarve, T.D., de Souza Filho, O.C., Sagrillo, M.R., Garcia, L.F.M., and da Cruz, I.B.M., 2012. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reproductive BioMedicine Online*, 24 (4), 474–481.
- da Costa, I.M., de Moura Freire, M.A., de Paiva Cavalcanti, J.R.L., de Araújo, D.P., Norrara, B., Moreira Rosa, I.M.M., de Azevedo, E.P., do Rego, A.C.M., Filho, I.A., and Guzen, F.P., 2018. Supplementation with *Curcuma longa* Reverses Neurotoxic and Behavioral Damage in Models of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Current Neuropharmacology*, 17 (5), 406–421.
- Dalcin, A.J.F., Vizzotto, B.S., Bochi, G. V., Guarda, N.S., Nascimento, K., Sagrillo, M.R., Moresco, R.N., Schuch, A.P., Ourique, A.F., and Gomes, P., 2019. Nanoencapsulation of the flavonoid dihydromyricetin protects against the genotoxicity and cytotoxicity induced by cationic nanocapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173 (July 2018), 798–805.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., and Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (2–3), 193–236.
- Fan, C., Song, Q., Wang, P., Li, Y., Yang, M., and Yu, S.Y., 2019. Neuroprotective effects of curcumin on IL-1 β -induced neuronal apoptosis and depression-like behaviors caused by chronic stress in rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12 (January), 1–17.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Ishihara, M., and Kadoma, Y., 2004. Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds. *Anticancer Research*, 24 (2 B), 563–569.
- Fukui, M., Choi, H.J., and Zhu, B.T., 2010. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (5), 800–813.
- Gartlon, J., Kinsner, A., Bal-Price, A., Coecke, S., and Clothier, R.H., 2006. Evaluation

- of a proposed in vitro test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 20 (8), 1569–1581.
- Ghasemi, F., Bagheri, H., Barreto, G.E., Read, M.I., and Sahebkar, A., 2019. Effects of Curcumin on Microglial Cells. *Neurotoxicity Research*, 36 (1), 12–26.
- Gündel, S., Reis, T.R., Copetti, P.M., Favarin, F.R., Sagrillo, M.R., da Silva, A.S., Segat, J.C., Baretta, D., and Ourique, A.F., 2019. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169 (August 2018), 207–215.
- Gündel, S.S., Velho, M.C., Diefenthaler, M.K., Favarin, F.R., Copetti, P.M., de Oliveira Fogaça, A., Klein, B., Wagner, R., Gündel, A., Sagrillo, M.R., and Ourique, A.F., 2018. Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 378–383.
- Hewlings, S. and Kalman, D., 2017. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods*, 6 (10), 92.
- Jaguezeski, A.M., Gündel, S.S., Favarin, F.R., Gündel, A., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Cazarotto, C.C., Volpato, A., Fortuoso, B.F., Ourique, A.F., and Da Silva, A.S., 2019. Low-dose curcumin-loaded Eudragit L-100-nanocapsules in the diet of dairy sheep increases antioxidant levels and reduces lipid peroxidation in milk. *Journal of Food Biochemistry*, 43 (8), 1–14.
- Khan, M.S., Muhammad, T., Ikram, M., and Kim, M.O., 2019. Dietary Supplementation of the Antioxidant Curcumin Halts Systemic LPS-Induced Neuroinflammation-Associated Neurodegeneration and Memory/Synaptic Impairment via the JNK/NF- κ B/Akt Signaling Pathway in Adult Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–23.
- Khazdair, M.R., Anaeigoudari, A., Hashemzahi, M., and Mohebbati, R., 2019. Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9 (2), 98–105.
- Kunwar, A., Barik, A., Mishra, B., Rathinasamy, K., Pandey, R., and Priyadarsini, K.I., 2008. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780 (4), 673–679.
- Liczbiński, P., Michałowicz, J., and Bukowska, B., 2020. Molecular mechanism of curcumin action in signaling pathways: Review of the latest research. *Phytotherapy Research*, 34 (8), 1992–2005.

- Maiti, P. and Dunbar, G., 2018. Use of Curcumin, a Natural Polyphenol for Targeting Molecular Pathways in Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (6), 1637.
- Mendonça, L.M., dos Santos, G.C., Antonucci, G.A., dos Santos, A.C., Bianchi, M. de L.P., and Antunes, L.M.G., 2009. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 675 (1–2), 29–34.
- Mursaleen, L., Somavarapu, S., and Zariwala, M.G., 2020. Deferoxamine and Curcumin Loaded Nanocarriers Protect Against Rotenone-Induced Neurotoxicity. *Journal of Parkinson's Disease*, 10 (1), 99–111.
- Nakamae, I., Morimoto, T., Shima, H., Shionyu, M., Fujiki, H., Yoneda-Kato, N., Yokoyama, T., Kanaya, S., Kakiuchi, K., Shirai, T., Meiyanto, E., and Kato, J.Y., 2019. Curcumin derivatives verify the essentiality of ROS upregulation in tumor suppression. *Molecules*, 24 (22), 1–25.
- Namgyal, D., Ali, S., Mehta, R., and Sarwat, M., 2020. The neuroprotective effect of curcumin against Cd-induced neurotoxicity and hippocampal neurogenesis promotion through CREB-BDNF signaling pathway. *Toxicology*, 442 (July), 152542.
- Parasuraman, S., 2011. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2 (2), 74–79.
- Del Prado-Audelo, M.L., Caballero-Florán, I.H., Meza-Toledo, J.A., Mendoza-Muñoz, N., González-Torres, M., Florán, B., Cortés, H., and Leyva-Gómez, G., 2019. Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. *Biomolecules*, 9 (2), 1–28.
- Qureshi, S., Shah, A.H., and Ageel, A.M., 1992. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. *Planta Medica*, 58 (2), 124–127.
- Rakotoarisoa, M. and Angelova, A., 2018. Amphiphilic Nanocarrier Systems for Curcumin Delivery in Neurodegenerative Disorders. *Medicines*, 5 (4), 126.
- Sadegh Malvajerd, S., Azadi, A., Izadi, Z., Kurd, M., Dara, T., Dibaei, M., Sharif Zadeh, M., Akbari Javar, H., and Hamidi, M., 2019. Brain Delivery of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Optimization, and Pharmacokinetic Evaluation. *ACS Chemical Neuroscience*, 10 (1), 728–739.
- Soleimani, V., Sahebkar, A., and Hosseinzadeh, H., 2018. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytotherapy Research*, 32 (6), 985–995.
- Syng-Ai, C., Kumari, A.L., and Khar, A., 2004. Effect of curcumin on normal and tumor

- cells: Role of glutathione and bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (9), 1101–1108.
- Tomeh, M.A., Hadianamrei, R., and Zhao, X., 2019. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (5), 1033.
- Umerska, A., Gaucher, C., Oyarzun-Ampuero, F., Fries-Raeth, I., Colin, F., Villamizar-Sarmiento, M.G., Maincent, P., and Sapin-Minet, A., 2018. Polymeric nanoparticles for increasing oral bioavailability of Curcumin. *Antioxidants*, 7 (4), 46.
- Vaiserman, A., Koliada, A., and Lushchak, O., 2020. Neuroinflammation in pathogenesis of Alzheimer's disease: Phytochemicals as potential therapeutics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 189, 111259.
- Wang, Z., Yang, C., Liu, J., Tong, B.C.K., Zhu, Z., Malampati, S., Sreenivasmurthy, S.G., Cheung, K.H., Iyaswamy, A., Su, C., Lu, J., Song, J., and Li, M., 2020. A curcumin derivative activates TFEB and protects against parkinsonian neurotoxicity in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (4), 1515.
- Wei, W., Dong, Q., Jiang, W., Wang, Y., Chen, Y., Han, T., and Sun, C., 2021. Dichloroacetic acid-induced dysfunction in rat hippocampus and the protective effect of curcumin. *Metabolic Brain Disease*, 36, 545–556.
- Willenbacher, E., Khan, S.Z., Mujica, S.C.A., Trapani, D., Hussain, S., Wolf, D., Willenbacher, W., Spizzo, G., and Seeber, A., 2019. Curcumin: New insights into an ancient ingredient against cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (8), 1–13.
- Xiang, B., Li, D., Chen, Y., Li, M., Zhang, Y., Sun, T., and Tang, S., 2020. Curcumin Ameliorates Copper-Induced Neurotoxicity Through Inhibiting Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Neurochemical Research*, 46, 367–378.
- Zaki, S.M., Algaleel, W.A.A., Imam, R.A., Soliman, G.F., and Ghoneim, F.M., 2020. Nano-curcumin versus curcumin in amelioration of deltamethrin-induced hippocampal damage. *Histochemistry and Cell Biology*, 154 (2), 157–175.
- Zhang, J., Zheng, Y., Luo, Y., Du, Y., Zhang, X., and Fu, J., 2019. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells. *Molecular Immunology*, 116 (May), 29–37.
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A.M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D.N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A.M., Santini, A., and Souto, E.B., 2020. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25 (16), 3731.

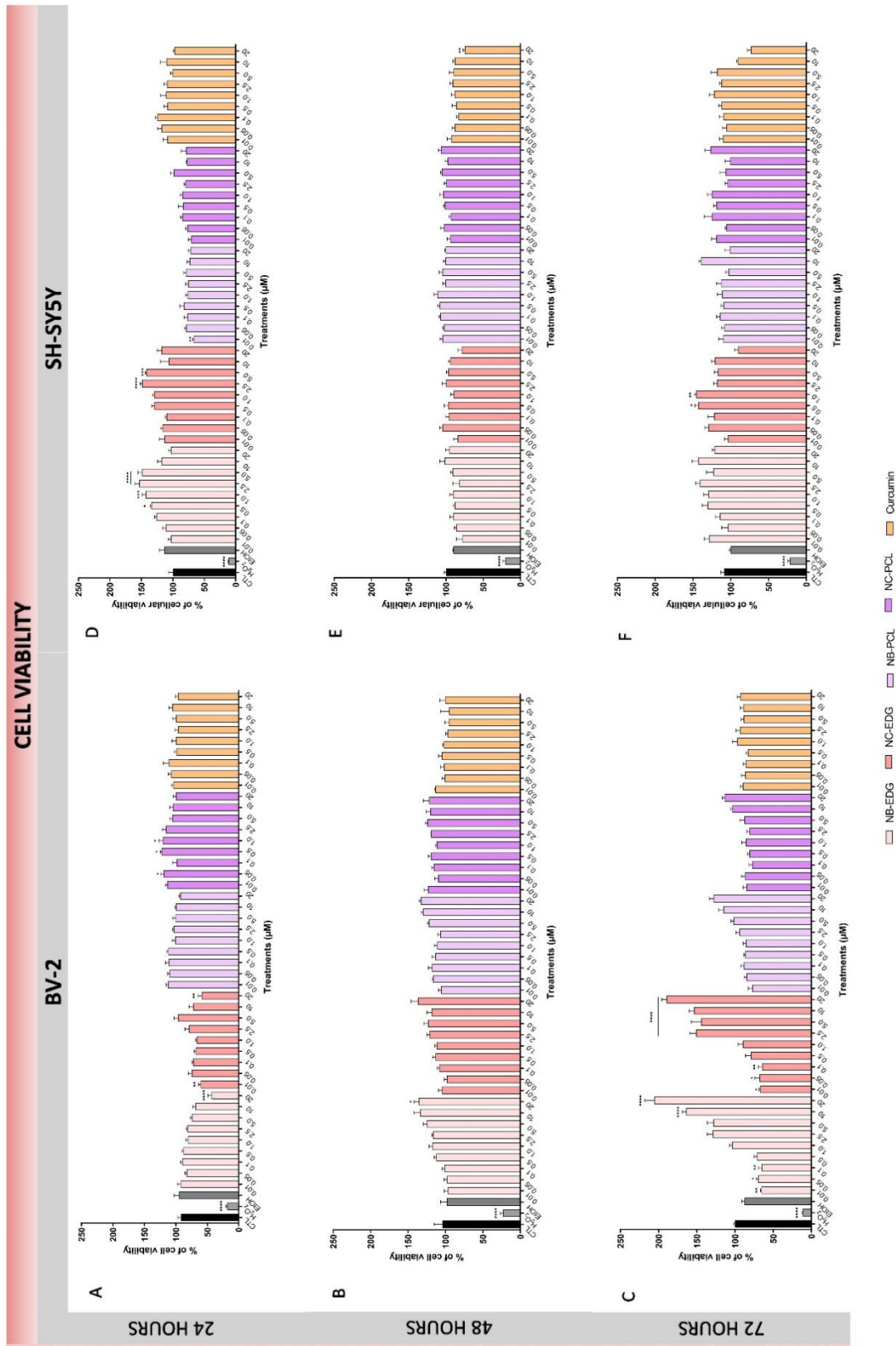


Fig. 1 Cellular viability or proliferative status using MTT assay. **a** BV-2 cells after 24 h of exposure to curcumin treatments. **b** BV-2 cells after 48 h of exposure to curcumin treatments. **c** BV-2 cells after 72 h of exposure to curcumin treatments. **d** SH-SY5Y cells after 24 h of exposure to curcumin treatments. **e** SH-SY5Y cells after 48 h of exposure to curcumin treatments. **f** SH-SY5Y cells after 72 h of exposure

to curcumin treatments. NB-EDG: nanocapsule of EDG without curcumin; NC-EDG: nanocapsule of EDG with curcumin; NB-PCL: nanocapsule of PCL without curcumin; NC-PCL: nanocapsule of PCL with curcumin; Curcumin: free curcumin; CTL: negative control. Statistical analysis was performed comparing treatment groups with the negative control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

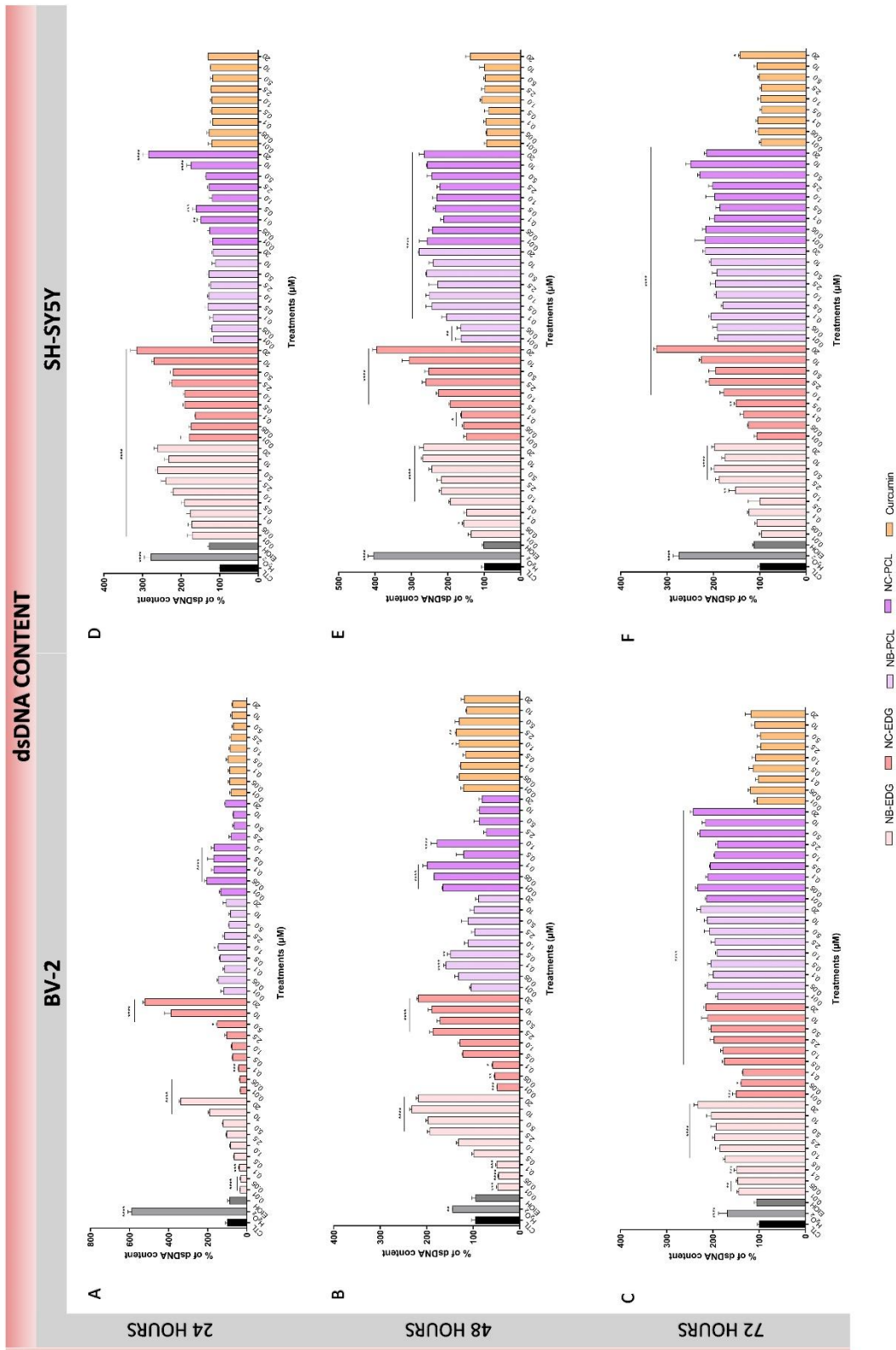


Fig. 2 Membrane damage and DNA exposure using the PicoGreen assay. **a** BV-2 cells after 24 h of exposure to curcumin treatments. **b** BV-2 cells after 48 h of exposure to curcumin treatments. **c** BV-2 cells after 72 h of exposure to curcumin treatments. **d** SH-SY5Y cells after 24 h of exposure to curcumin treatments. **e** SH-SY5Y cells after 48 h of exposure to curcumin treatments. **f** SH-SY5Y cells after 72 h

of exposure to curcumin treatments. NB-EDG: nanocapsule of EDG without curcumin; NC-EDG: nanocapsule of EDG with curcumin; NB-PCL: nanocapsule of PCL without curcumin; NC-PCL: nanocapsule of PCL with curcumin; Curcumin: free curcumin; CTL: negative control. Statistical analysis was performed comparing treatment groups with the negative control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

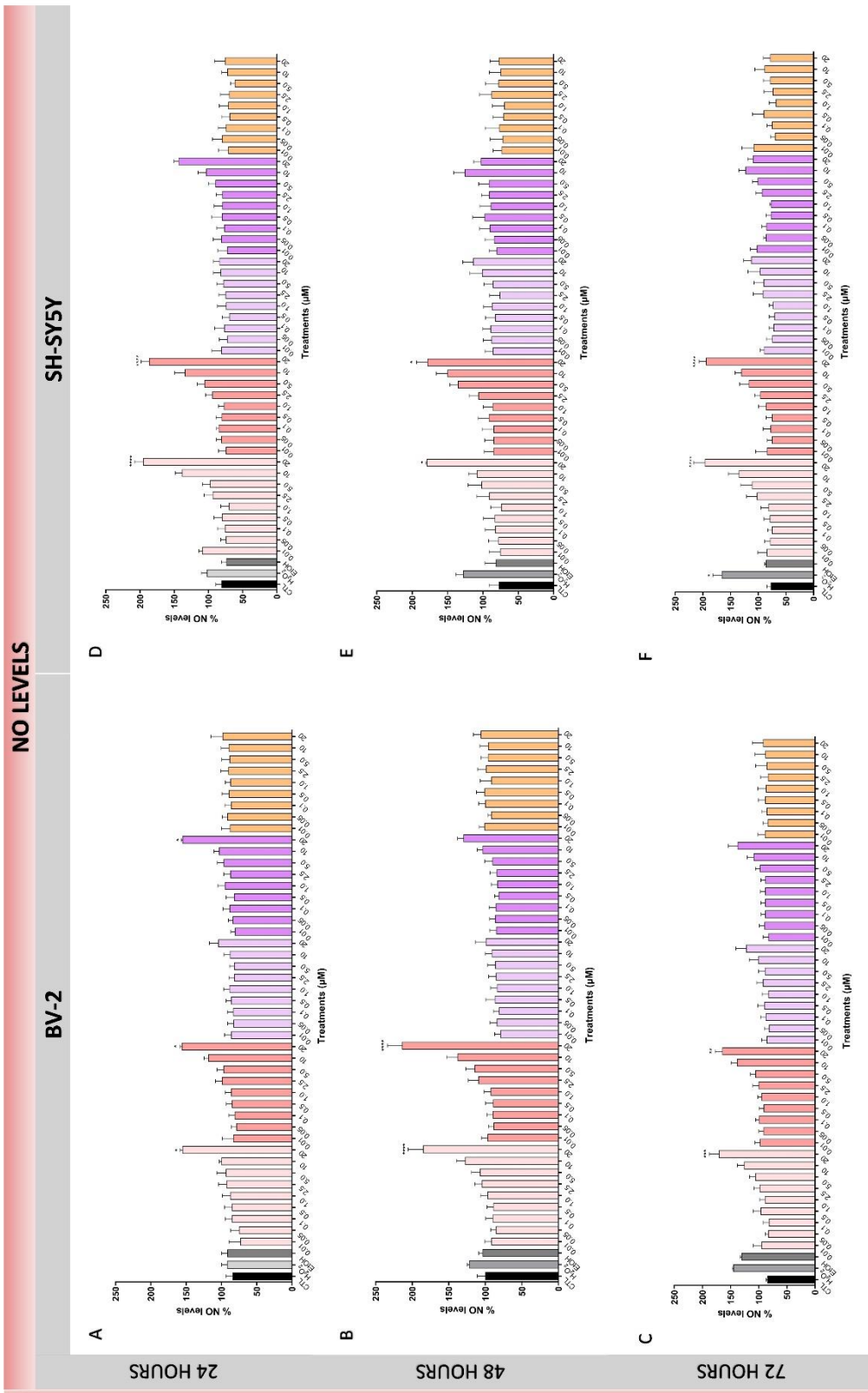


Fig. 3 NO levels in supernatants using Griess reagent. **a** BV-2 cells after 24 h of exposure to curcumin treatments. **b** BV-2 cells after 48 h of exposure to curcumin treatments. **c** BV-2 cells after 72 h of exposure to curcumin treatments. **d** SH-SY5Y cells after 24 h of exposure to curcumin treatments. **e** SH-SY5Y cells after 48 h of exposure to curcumin treatments. **f** SH-SY5Y cells after 72 h of exposure

to curcumin treatments. NB-EDG: nanocapsule of EDG without curcumin; NC-EDG: nanocapsule of EDG with curcumin; NB-PCL: nanocapsule of PCL without curcumin; NC-PCL: nanocapsule of PCL with curcumin; Curcumin: free curcumin; CTL: negative control. Statistical analysis was performed comparing treatment groups with the negative control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

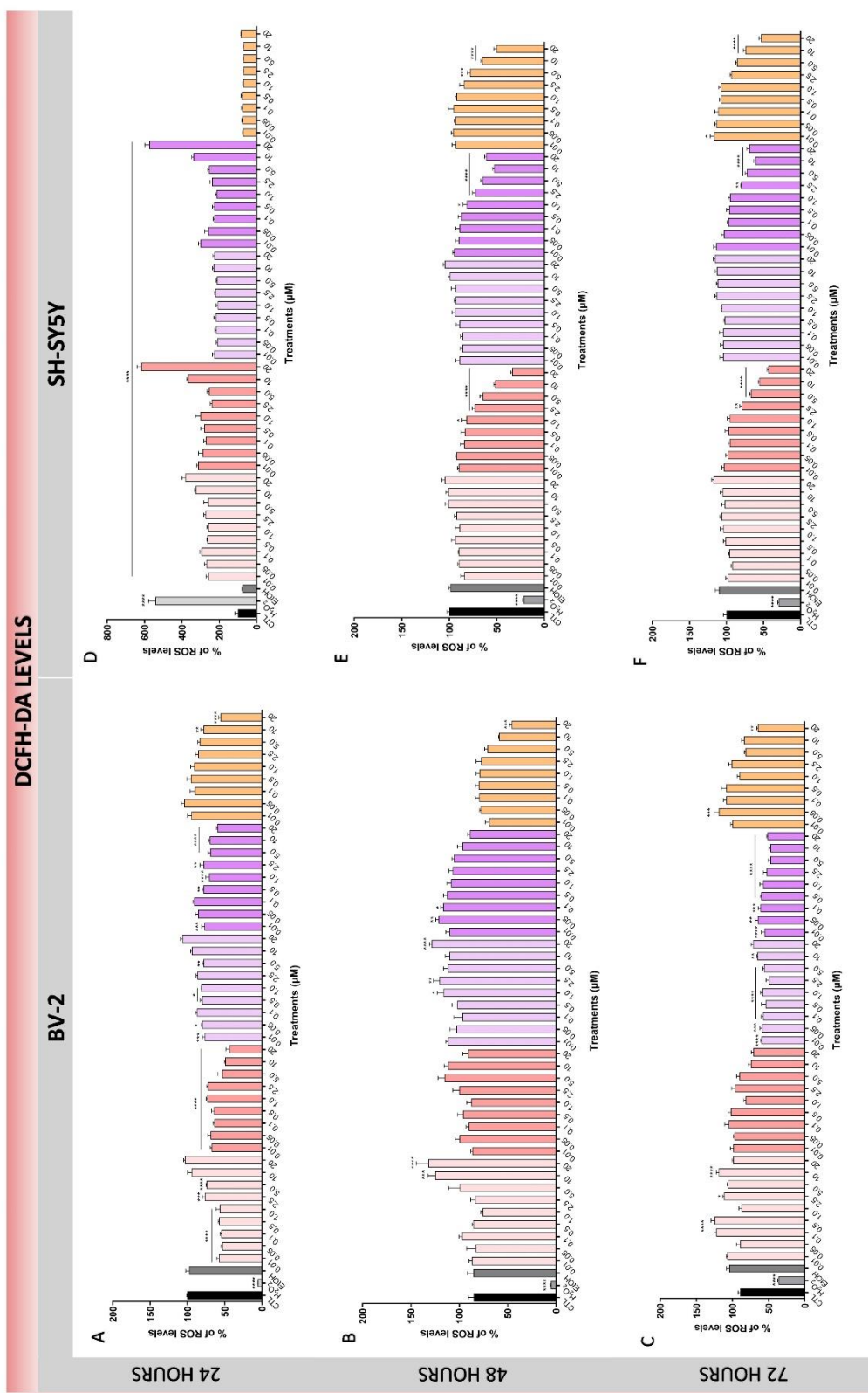


Fig. 4 ROS levels in supernatants using DCFH-DA reagent. **a** BV-2 cells after 24 hours of exposure to curcumin treatments. **b** BV-2 cells after 48 h of exposure to curcumin treatments. **c** BV-2 cells after 72 h of exposure to curcumin treatments. **d** SH-SY5Y cells after 24 hours of exposure to curcumin treatments. **e** SH-SY5Y cells after 48 hours of exposure to curcumin treatments. **f** SH-SY5Y cells after

72 hours of exposure to curcumin treatments. NB-EDG: nanocapsule of EDG without curcumin; NC-EDG: nanocapsule of EDG with curcumin; NB-PCL: nanocapsule of PCL without curcumin; NC-PCL: nanocapsule of PCL with curcumin; Curcumin: free curcumin; CTL: negative control. Statistical analysis was performed comparing treatment groups with the negative control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

	NC-PCL (2 mg/mL)	NB-PCL	NC-EDG (0,25 mg/mL)	NB-EDG
Medium particle size (nm)	194 ± 0,31	188 ± 1,10	168 ± 1,96	169 ± 1,08
Polydispersity index	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,02
Zeta potencial (mV)	- 8,16 ± 0,53	- 7,25 ± 0,67	- 17,00 ± 1,04	- 17,53 ± 1,30
pH	6,23 ± 0,02	6,35 ± 0,03	4,35 ± 0,02	4,33 ± 0,02
Curcumin content (mg/mL)	2,03 ± 0,01	-	0,24 ± 0,02	-
Encapsulation efficiency (%)	100 ± 0,01	-	99 ± 0,01	-

Supplemental Table 1 Physio-chemical characteristics of curcumin nanocapsules and nanocapsules without curcumin. NC-PCL: nanocapsule of PCL with curcumin; NB-PCL: nanocapsule of PCL without curcumin; NC-EDG: nanocapsule of EDG with curcumin; NB-EDG: nanocapsule of EDG without curcumin.

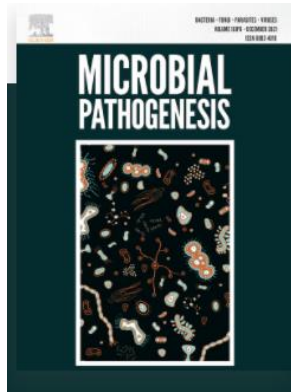
3.2 MANUSCRITO

Manuscrito será submetido na revista **Microbial Pathogenesis**.

ISSN: 0882-4010

Fator de impacto 3.738 (2020) – Qualis B2 (área CBII).

Título: *Curcumin modulates neurogliogenesis and purinergic receptors expression in a congenital toxoplasmosis model with neural precursor cells*



Curcumin modulates neurogliogenesis and purinergic receptors expression in a congenital toxoplasmosis model with neural precursor cells

Bianca Fagan Bissacotti^{a*}, Priscila Marquezan Copetti^a, Nathieli Bianchin Bottari^a,
Taís Vidal^a, Micheli Mainardi Pillat^b, Cinthia Melazzo de Andrade^a; Vera Maria
Melchiors Morsch^a, Aleksandro Schafer da Silva^{a,c}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^b Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

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

*B.F.B. is corresponding author: Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFSM. Avenida Roraima, nº 1000, Camobi District, Zip Code 97105900, Santa Maria, Brazil. E-mail: bianca_fbissacotti@hotmail.com

HIGHLIGHTS

- *T. gondii* transplacental infection prejudice determination of neural fate;
- Neuroprotection, mediated by A1, is compromised in toxoplasmosis;
- Curcumin acts as a neuroprotector in congenital toxoplasmosis;
- Curcumin prevents negative effects of *T. gondii* on embryonic neurogenesis;
- Curcumin is a potent agent for the treatment of congenital toxoplasmosis.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that causes toxoplasmosis and its congenital transmission is of main concern. During embryonic development, an infection with the parasite causes irreversible damage to the central nervous system (CNS) of the still-forming fetus. With the placental passage of *T. gondii*, processes such as proliferation, migration and differentiation of neural precursor cells (NPCs) are compromised. In the pathogenesis of neurotoxoplasmosis, purinergic receptors prejudice neuroprotection, neuroinflammation and activation of microbicides mechanisms against the parasitic vacuole. In this study, we used curcumin, an anti-inflammatory and neuroprotective polyphenol as a treatment in NPCs infected with *T. gondii*. The model of congenital toxoplasmosis induction consisted of maternal infection with the VEG strain and NPCs were obtained from the telencephalon of mouse embryos. Curcumin (0.5 – 20 μ M) was administered *in vitro* to analyze NPCs' mitochondrial viability, cell number, and size. 2.5 and 5.0 μ M concentrations of curcumin were used to analyze neurogliogenesis, purinergic receptors A1, A2A, P2X7 expression, and ERK $\frac{1}{2}$ signalling pathway. Results indicated impairments in neurogenesis and expression of receptors in infected NPCs. Curcumin acted positively in the reestablishment of cell differentiation, purinergic components, and ERK signalling pathway, possibly with neuroprotection, neuroinflammatory control, and activation of mechanisms capable of acting to effect the death of the parasite. Therefore, we conclude that curcumin can be used as a therapeutic in congenital toxoplasmosis.

KEYWORDS: Curcumin; ERK signalling; Neural differentiation; Neurogenesis; Purinergic receptors; Toxoplasmosis.

1. Introduction

Toxoplasmosis is a disease caused by the obligatory intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Humans are intermediate hosts, which can become infected through water or food contaminated with oocysts, an infectious form of the pathogen [1]. Approximately one-third of the world population is chronically infected, and the main concerns of this disease are focused on cases of neurotoxoplasmosis and congenital toxoplasmosis [1,2]. Neurological changes are observed in the presence of cysts containing bradyzoites in brain tissue [3,4].

In this study, we focus on congenital toxoplasmosis, a form of transmission of the parasite that can act harmfully in the formation of the developing embryo [5]. Clinical signals, mainly related to the central nervous system (CNS), are observed in contaminated births, such as hydrocephalus, cerebral malformations, behavioural alterations and learning difficulties. Cases of miscarriages and stillbirths can also be found [6,7].

It is already known that the parasite is capable of infecting neural cells, promoting or inhibiting cell apoptosis, in addition to interfering with the migration and differentiation of neural precursor cells (NPCs) of a developing embryo [3,8]. NPCs are capable of originating neural cells such as neurons, astrocytes and oligodendrocytes, which are essential to compose an individual's CNS [9].

The purinergic system is an important signalling pathway found in physiological and pathological processes. For example, during the development of the embryonic CNS, purinergic components have been found to regulate this complex process and alterations in this pathway can directly compromise its formation [10]. The P2X7 purinergic receptor during neurogenesis is responsible for the regulation of cell apoptosis. Stimulation of the A1 receptor promotes proliferation through the MEK/ERK and Akt pathway [10,11].

Purinergic receptors P2X7, A1 and A2A are widely found in neural cells and involved in the pathogenesis of toxoplasmosis. Activation of P2X7 is essential for the recruitment of the immune system to eliminate the parasite [12,13], while the A1 receptor in the CNS has a neuroprotective role [14]. A2A activation in NPCs infected with *T. gondii* is related to attenuation of inflammation, which can generate, in this case, tissue damage by the action of the parasite [15].

Due to the severity of the findings of congenital toxoplasmosis, in this study, we suggest the use of a natural compound, curcumin, to minimize the alterations found

during infection with *T. gondii*. Curcumin is a polyphenol present in highest concentration in the roots of *Curcuma longa* and is described as having anti-inflammatory and antimicrobial properties, in addition to being beneficial in diseases involving the CNS [16,17]. Curcumin acts on the pathway of protein kinases, such as MAPK and ERK ½, inhibiting them to attenuate inflammatory responses [18]. Adult hippocampal neurogenesis is also re-established with the use of curcumin after cadmium-induced neurotoxicity [19]. In chronic toxoplasmosis, curcumin nanoemulsions were able to reduce the size and number of tissue cysts [20].

Therefore, given the above problems and the promising findings for the use of curcumin in *T. gondii* infection, this study aimed to evaluate the therapeutic potential of curcumin in infected NPCs obtained from the telencephalon of mouse embryos in neural differentiation and expression of purinergic receptors and the ERK ½ signalling pathway.

2. Materials and methods

2.1. Animals and infection

Six Swiss female mice and three Swiss male mice with 45-60 days weighing 25 ± 5 g were used in this study. Female and male mice were kept in separate boxes containing three animals each, in a controlled environment with 12 h light/dark cycle and 25° C temperature and 70% humidity, receiving water and food ad libitum. All procedures were approved by the Ethics Committee on Animals of the Federal University of Santa Maria (UFSM, under protocol number 5191130919). After the adaptation period, four females were orally infected with *T. gondii*, VEG strain (type III). Twenty days after infection, males were placed with females, remaining together for up to two days.

2.2. Isolation and culture of neural progenitor cells (NPCs)

NPCs were isolated from the embryo's telencephalon on the 13th day of gestation according to the method of Hutton and Pevny (2008) [21]. The removed embryonic telencephalon was incubated in 0.1% trypsin (Life Technologies) at 37° C for 5 minutes and the cells were mechanically dissociated. NPCs were cultured at a concentration of 2x10⁵ cells/ml in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) supplemented with 2% of B-27 (Life Technologies), 20 ng/ml of epidermal growth factor (EGF), (Sigma-Aldrich) and fibroblast growth factor (FGF)-2 (Sigma-Aldrich) and 1%

antibiotic (penicillin/streptomycin), (Gibco) and stored at 37°C with 95% oxygen and 5% CO₂ for 5 days.

2.3. Treatment

Curcumin (Sigma-Aldrich) was diluted in ethanol solvent (Sigma-Aldrich) and added in NPCs cultures at concentrations of 0.5 – 20 µM until cell differentiation (5 days). 12 µmol/L sulfamethoxazole-trimethoprim (Eurofarma) was used as a treatment, as it is a drug prescribed to patients with toxoplasmosis [22]. Furthermore, the combined treatment of curcumin and sulfamethoxazole-trimethoprim was tested.

2.4. Number and Size of NPCs

The counting of the number of NPCs was performed using an inverted optical microscope and size was analyzed with ImageJ software. The results were transformed to percentages for the uninfected control group.

2.5. Mitochondrial Viability of NPCs

Mitochondrial viability of uninfected and infected NPCs treated with curcumin were evaluated using the MTT assay. Cells were incubated with MTT reagent (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), (Sigma-Aldrich) at 5 mg/mL for up to 2 h. Then, dimethylsulphoxide (Sigma-Aldrich) was added, and the absorbance was determined at 560 nm [23]. The results were transformed to percentages for the uninfected control group.

2.6. Flow Cytometry Analysis

Neurospheres were fixed in 1% paraformaldehyde (PFA) in phosphate saline buffer (PBS) for 20 minutes, then washed with PBS containing 2% FBS and incubated for 30 minutes with primary antibodies being anti-Glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1: 100, Sigma-Aldrich), anti-Neuron-specific protein (Neu-N, 1:100, Sigma-Aldrich), anti-P2X7 purinergic receptor (1:200, Sigma-Aldrich), anti-A₁ adenosine receptor (1:100, Sigma-Aldrich), anti-A_{2A} (1:100, Sigma-Aldrich) and anti-Mitogen Activated Protein Kinase (ERK ½, 1:200, Sigma-Aldrich). After washing with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 488- or 555-conjugated secondary antibodies (1:500, Life-Technologies) and analyzed by flow cytometer (BD Accuri). Forty thousand events were acquired per sample. Forward and side light-scatter signals were used to exclude dead cells and debris. Data were analyzed using the FlowJo V10 software [24,25].

2.7. Statistical analysis

Statistical differences between groups were analyzed using two-way ANOVA, followed by the Tukey test, using GraphPad Prism 8 software. The data were presented as mean \pm SEM. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Inhibitory effect of curcumin on the size of infected NPCs

Infected and uninfected NPCs were exposed to different concentrations of curcumin for an initial evaluation with methods of mitochondrial viability, cell count, and size (Fig 1). There was no difference in mitochondrial viability between uninfected and infected NPCs; only the higher concentration of curcumin was able to cause a reduction of % viable cells in uninfected and infected cells. The opposite was observed for 0.5 μ M of curcumin in uninfected NPCs when compared to control (Fig. 1A).

As for counting the number of NPCs, more significant results were observed. The number of cells was increased in the infected group compared to the uninfected. However, curcumin concentrations of 0.5 – 2.5 μ M significantly reduced the number of NPCs to infected cells. 20 μ M curcumin reduced the number of uninfected and infected NPCs, according to the MTT test (Fig. 1B).

To analyze the action of curcumin and the parasite during infection, NPC size was also used. In neurospheres infected with *T. gondii*, size was significantly increased compared to the uninfected; however, the infected and curcumin-treated neurospheres were able to return to the size of the uninfected ones (Fig. 1C). The Figure 2D illustrates neurospheres infected and uninfected and also treated with 2.5 and 5.0 μ M of curcumin, as chosen, according to previous tests, for the experiments to follow.

Supplementary Material 1 show the results of mitochondrial viability, quantity, and size of NPCs treated with sulfamethoxazole-trimethoprim (sulfa) and its action with curcumin, where more significant differences are observed in the number of NPCs.

3.2. Curcumin attenuates neuroinflammation-related P2X7 receptor expression and increases A1 expression, indicating neuroprotection

P2X7, A1, and A2A receptors were chosen to analyze the influence of the parasite and curcumin treatment on purinergic signalling. Neurospheres infected with *T. gondii* showed a reduction in the expression of the A1 receptor, as well as with 2.5 μ M treatment in cells also infected, compared to control. At 5 μ M of curcumin in infected

neurospheres was able to reverse the negative effect that *T. gondii* infection causes on neuroprotection (Fig. 2A).

In contrast, A2A receptor expression was not significantly different between infected and uninfected neurospheres. An increase was observed only in treatment with curcumin at both concentrations in infected neurospheres, for uninfected and infected controls (Fig. 2B). Increased expression of P2X7 receptor was observed in neurospheres with *T. gondii*; when treated with 5 μ M this increased effect returned to control levels (Fig. 2C).

3.3. Curcumin stimulates neurogliogenesis in infected neurospheres and reverses the action of *T. gondii* on ERK 1/2 signalling

To analyze the differentiation of NPCs, the expression of neural marker proteins was determined by flow cytometry. The percentage of neurons (NeuN⁺) and differentiated and undifferentiated glial cells (GFAP⁺) can be seen in Fig. 3A and 3B, respectively.

Toxoplasmosis infection increased the percentage of neurons, indicating that the parasite interferes in neurogenesis. Curcumin at a concentration of 2.5 μ M in uninfected and infected cells also increased the number of mature neurons, stimulating neurogenesis (Fig. 3A). Gliogenesis was not affected by the infection; only 2.5 μ M of curcumin in infected cells increased the percentage of glial cells, compared to its control.

Finally, in Fig. 3C, toxoplasmosis and curcumin modulation in ERK 1/2 signalling pathway were demonstrated. Infected neurospheres increased the expression of the MAPkinase pathway; curcumin, on the other hand, suppressed the expression. When infection and treatment are analyzed, the reduction is more evident.

4. Discussion

The congenital infection of the *T. gondii* parasite plays a critical role in the formation of the fetal CNS [7]. Our research investigated the therapeutic effect of curcumin on infected NPCs.

The CNS is the main organ of the parasite's encystment in mammals, playing a central role in the persistence and pathogenesis of toxoplasmosis [3,4]. During neurogenesis, the pathogen invades NPCs, causing damage to cell growth, migration and differentiation, compromising brain development [3,8]. In the present study, the quantity and size of neurospheres were increased against infection (Fig 1B and 1C).

Depending on the cell type and virulence of the strain, the parasite can inhibit or activate apoptosis [26]. Said increase in size may be related to the invasion of the parasite into the cell, forming the parasitic vacuole, thus installing a chronic infection with presence of cysts containing bradyzoites, since the VEG strain is cystogenic [27,28]. During cell invasion, parasites activate the mitogen, activating the pathway of proteins ERK, P38, and JNK [29]. We confirmed the increase in ERK $\frac{1}{2}$ expression in infected neurospheres, and the activation of this pathway is related to cell proliferation (Fig. 3C).

Curcumin was used in this study as a possible target that exerts adverse effects on congenital toxoplasmosis. 2.5 and 5.0 μM curcumin concentrations were effective in restoring the size of infected NPCs, without changing the cell viability of the uninfected control group and restoring the number of cells during infection (Fig. 1B and 1C).

It is important to note that the higher concentration of curcumin in both uninfected and infected NPCs reduced mitochondrial viability and number (Fig. 1A and 1B). Our results are in agreement with Bissacotti et al. [30], who verified the cell viability and oxidative status of curcumin in healthy neural cells. High concentrations of curcumin (above 20 μM) are related to the loss of cell viability of neurons and microglia, triggering altered oxidative processes. Also, non-toxic concentrations of curcumin are between 2.5-5.0 μM , which do not cause evident damage to the homeostasis of these cells [30].

As a preliminary form of study, the viability and size of NPCs were evaluated against the associated use of curcumin and sulfa (Supplemental Material 1). Studies reveal that when the use of conventional treatment is accompanied by antioxidants, there is an increase in the therapeutic effectiveness in combating toxoplasmosis [31,32]. In summary, greater statistical differences were observed regarding the number of NPCs, and complementary studies should be carried out to verify the effectiveness of the association of polyphenol with conventional treatment.

In addition to the changes previously described, NPCs migration and differentiation were compromised in *T. gondii* infection [3,8]. Neurogenesis is a crucial process during embryonic development. Given these harmful actions of the parasite, we investigated the process of differentiation of neurospheres in parasitic disease and after curcumin treatment. Quantitative analysis of GFAP⁺ cells (differentiated and

undifferentiated glial cells) and NeuN⁺ (neurons) was performed by flow cytometry (Fig. 3A and 3B).

The results indicate that toxoplasmosis stimulates neurogenesis, going in the opposite direction to the findings in the literature, since a study showed that *T. gondii* stimulates the gliogenesis process [8]. During cerebral toxoplasmosis pathogenesis, the parasite prefers to infect microglia than neurons. Therefore, we suggest that the neurogenesis stimulation is due to the functional impairment of infected microglia, preventing their efficient proliferation, migration and differentiation, opening paths for exacerbated stimulus in the production of neurons, in an attempt to compensate for glial loss [3,4]. At 2.5 μ M of curcumin was able to restore the amount of GFAP⁺ cells in infected NPCs, but not neurogenesis, triggering an overexpression of NeuN⁺ cells, as already observed in uninfected NPCs. The 5.0 μ M concentration showed no significant difference in both neurogenesis and gliogenesis.

Finally, we analyzed the role of the purinergic system in neuroinflammation and neuroprotection during congenital toxoplasmosis and the use of curcumin as a treatment. The evidence that nucleotides and purinergic receptors participate in the regulation of embryonic development [10], as well as their action in mediating inflammation and protection during chronic toxoplasmosis [13–15,33] motivated the study of the A1, A2A, and P2X7 receptors expressions. ATP release during the parasite invasion promotes activation of the P2X7 receptor on the cell surface, which contributes to the development of death mechanisms that act on the parasitic vacuole and recruitment of inflammatory mediators [33]. Curcumin decreases P2X7 activation due to the regulation of exacerbated inflammation triggered by infection, acting with its anti-inflammatory function which has been widely proven (Fig. 2C). Together, the A2A receptor, activated by adenosine, acts to attenuate inflammation. Differences were not observed between the infected and non-infected groups, but curcumin managed to activate the receptor related to neuroinflammatory control (Fig. 2B) [34].

In neurogenesis, the A1 receptor promotes proliferation through the MEK/ERK Akt pathway [11], in addition to acting with a neuroprotective role in the CNS [14]. Our results reveal a decrease in neuroprotection in infected NPCs, with curcumin increasing A1 expression levels (Fig. 2A). Infected neurospheres increased ERK $\frac{1}{2}$ signalling, inducing proliferation, while curcumin reversed this effect, restoring cell quantity, as well as attenuating inflammation, processes controlled by the MAPK pathway (Fig. 3C). Together, these data highlight the changes in the processes of

proliferation and differentiation of NPCs and purinergic receptors against a model of congenital toxoplasmosis. We enable a better understanding of the curcumin therapeutic action in the modulation of neurogenesis and purinergic receptors, as well as provide evidence of the effective action of the ERK 1/2 pathway to combat the damage induced by *T. gondii*.

5. Conclusion

Our study revealed the potential effect of curcumin on the neurogliogenesis of infected NPCs, as well as a possible restoration of cellular quantity, neuroprotection and neuroinflammatory control mediated by purinergic receptors A1, A2A, and P2X7 and ERK 1/2 signalling pathway. Therefore, we suggest the use of curcumin as a therapeutic agent because it minimizes the effects generated by *T. gondii* in its congenital form.

Ethics committee

This work was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Santa Maria (UFSM), protocol number 5191130919.

Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES/PROEX process n° 88887.372278/2019-00.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

BFB, PMC, TV, MMP and NBB performed the experiments. BFB also analyzed the data and wrote the manuscript. VMMM, NBB and ASS revised the manuscript and funding reagents. All authors read and approved the publication of this manuscript.

References

- [1] I.R. Dunay, K. Gajurel, R. Dhakal, O. Liesenfeld, J.G. Montoya, Treatment of Toxoplasmosis : Historical Perspective , *Animal, Clin. Microbiol. Infect.* 31 (2018) 1–33.
- [2] F. Yarovinsky, Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 109–121. <https://doi.org/10.1038/nri3598>.
- [3] A. Parlog, D. Schlüter, I.R. Dunay, *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations, *Parasite Immunol.* 37 (2015) 159–170. <https://doi.org/10.1111/pim.12157>.
- [4] O.A. Mendez, A.A. Koshy, *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system, *PLoS Pathog.* 13 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006351>.
- [5] J.A. Vargas-Villavicencio, A. Besné-Mérida, D. Correa, Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review, *Vet. Parasitol.* 223 (2016) 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.024>.
- [6] H.M. Elsheikha, Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action, *Public Health.* 122 (2008) 335–353. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2007.08.009>.
- [7] J.B. McAuley, Congenital toxoplasmosis, *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 3 (2014) 30–35. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu077>.
- [8] N.B. Bottari, M.R.C. Schetinger, M.M. Pillat, T. V. Palma, H. Ulrich, M.S. Alves, V.M. Morsch, C. Melazzo, L.D. de Barros, J.L. Garcia, A.S. Da Silva, Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii*, *Mol. Neurobiol.* 56 (2019) 2328–2338. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1180-z>.
- [9] K. Obernier, A. Alvarez-Buylla, Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain, *Dev.* 146 (2019). <https://doi.org/10.1242/dev.156059>.
- [10] G. Burnstock, H. Ulrich, Purinergic signaling in embryonic and stem cell

development, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 1369–1394. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0614-1>.

- [11] H. Migita, K. Kominami, M. Higashida, R. Maruyama, N. Tuchida, F. McDonald, F. Shimada, K. Sakurada, Activation of adenosine A1 receptor-induced neural stem cell proliferation via MEK/ERK and Akt signaling pathways, *J. Neurosci. Res.* 86 (2008) 2820–2828. <https://doi.org/10.1002/jnr.21742>.
- [12] A.C.A. Moreira-Souza, T.P. Rangel, S.R.B. da Silva, V.R. Figliuolo, L.E.B. Savio, F. Schmitz, C.M. Takiya, A.T.S. Wyse, R.C. Vommaro, R. Coutinho-Silva, Disruption of Purinergic Receptor P2X7 Signaling Increases Susceptibility to Cerebral Toxoplasmosis, *Am. J. Pathol.* 189 (2019) 730–738. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.01.001>.
- [13] S.E. Jamieson, A.L. Peixoto-Rangel, A.C. Hargrave, L.A.D. Roubaix, E.J. Mui, N.R. Boulter, E.N. Miller, S.J. Fuller, J.S. Wiley, L. Castellucci, K. Boyer, R.G. Peixe, M.J. Kirisits, L.D.S. Elias, J.J. Coyne, R. Correa-Oliveira, M. Sautter, N.C. Smith, M.P. Lees, C.N. Swisher, P. Heydemann, A.G. Noble, D. Patel, D. Bardo, D. Burrowes, D. McLone, N. Roizen, S. Withers, L.M.G. Bahia-Oliveira, R. McLeod, J.M. Blackwell, Evidence for associations between the purinergic receptor P2X 7 (P2RX7) and toxoplasmosis, *Genes Immun.* 11 (2010) 374–383. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.31>.
- [14] M.P. Abbracchio, G. Burnstock, A. Verkhratsky, H. Zimmermann, Purinergic signalling in the nervous system: an overview, *Trends Neurosci.* 32 (2009) 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>.
- [15] N.B. Bottari, M.M. Pillat, M.R.C. Schetinger, K.P. Reichert, V. Machado, C.E. Assmann, H. Ulrich, A. Dutra, V.M. Morsch, T. Vidal, I.B.M. Da Cruz, C. Melazzo, A.S. Da Silva, Resveratrol-mediated reversal of changes in purinergic signaling and immune response induced by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells, *Purinergic Signal.* 15 (2019) 77–84. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9634-3>.
- [16] Z. Ayati, M. Ramezani, M.S. Amiri, A.T. Moghadam, H. Rahimi, A. Abdollahzade, A. Sahebkar, S.A. Emami, Ethnobotany, Phytochemistry and Traditional Uses of *Curcuma* spp. and Pharmacological Profile of Two Important Species (*C. longa*

- and *C. zedoaria*): A Review, *Curr. Pharm. Des.* 25 (2019) 871–935. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190402163940>.
- [17] A. Bhat, A.M. Mahalakshmi, B. Ray, S. Tuladhar, T.A. Hediya, E. Manthiannem, J. Padamati, R. Chandra, S.B. Chidambaram, M.K. Sakharkar, Benefits of curcumin in brain disorders, *BioFactors.* 45 (2019) 666–689. <https://doi.org/10.1002/biof.1533>.
- [18] B. Aggarwal, S. Chitra, M. Nikita, I. Haruyo, Curcumin: The Indian solid gold, *Adv. Exp. Med. Biol.* 595 (2007) 1–75. http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L354122020%0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1.
- [19] D. Namgyal, S. Ali, R. Mehta, M. Sarwat, The neuroprotective effect of curcumin against Cd-induced neurotoxicity and hippocampal neurogenesis promotion through CREB-BDNF signaling pathway, *Toxicology.* 442 (2020) 152542. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152542>.
- [20] S.J. Azami, A. Teimouri, H. Keshavarz, A. Amani, F. Esmaeili, H. Hasanpour, S. Elikae, H. Salehiniya, S. Shojaee, Curcumin nanoemulsion as a novel chemical for the treatment of acute and chronic toxoplasmosis in mice, *Int. J. Nanomedicine.* 13 (2018) 7363–7374. <https://doi.org/10.2147/IJN.S181896>.
- [21] S.R. Hutton, L.H. Pevny, Isolation, culture, and differentiation of progenitor cells from the central nervous system, *Cold Spring Harb. Protoc.* 3 (2008) 1–6. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5077>.
- [22] T.C. Gomes, H.F. de Andrade Júnior, S.A.Z. Lescano, V. Amato-Neto, In vitro action of antiparasitic drugs, especially artesunate, against *Toxoplasma gondii*, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45 (2012) 485–490. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000400014>.
- [23] M. Fukui, H.J. Choi, B.T. Zhu, Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 800–813. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.002>.
- [24] F.H. McLaren, C.N. Svendsen, P. Van Der Meide, E. Joly, McLaren FH, 2001.pdf, 112 (2001) 35–46.

- [25] M.M. Pillat, A. Cheffer, C.M. de Andrade, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, H. Ulrich, Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: Consequence or cause of neuronal enrichment?, *Cytom. Part A.* 87 (2015) 929–935. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22705>.
- [26] T. Wang, M. Liu, X.J. Gao, Z.J. Zhao, X.G. Chen, Z.R. Lun, *Toxoplasma gondii*: The effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice, *Exp. Parasitol.* 127 (2011) 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.003>.
- [27] C.O. Contreras-Ochoa, A. Lagunas-Martínez, J. Belkind-Gerson, J. Díaz-Chávez, D. Correa, *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules, *Exp. Parasitol.* 134 (2013) 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.010>.
- [28] D.K. Howe, L.D. Sibley, *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease, *J. Infect. Dis.* 172 (1995) 1561–1566. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>.
- [29] A. Valère, R. Garnotel, I. Villena, M. Guenounou, J.M. Pinon, D. Aubert, Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion, *Parasite.* 10 (2003) 59–64. <https://doi.org/10.1051/parasite/2003101p59>.
- [30] B.F. Bissacotti, P.M. Copetti, N.B. Bottari, S. da S. Gündel, A.K. Machado, M.R. Sagrillo, A.F. Ourique, V.M.M. Morsch, A.S. da Silva, Impact of free curcumin and curcumin nanocapsules on viability and oxidative status of neural cell lines, *Drug Chem. Toxicol.* (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.2015242>.
- [31] N.B. Bottari, M.D. Baldissera, A.A. Tonin, V.C. Rech, V.S.K. Nishihira, G.R. Thomé, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, G. Camillo, F.F. Vogel, C. Tochetto, R. Figuera, G. Machado, L.M. Stefani, A.S. Da Silva, Sulfamethoxazole-trimethoprim associated with resveratrol for the treatment of toxoplasmosis in mice: Influence on the activity of enzymes involved in brain neurotransmission, *Microb. Pathog.* 79 (2015) 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.01.001>.

- [32] N.B. Bottari, M.D. Baldissera, A.A. Tonin, V.C. Rech, V.S.K. Nishihira, G.R. Thomé, G. Camillo, F.F. Vogel, M.M.M.F. Duarte, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, C. Tochetto, R. Fighera, A.S. Da Silva, Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim associated to resveratrol on its free form and complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on cytokines levels of mice infected by *Toxoplasma gondii*, *Microb. Pathog.* 87 (2015) 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.013>.
- [33] A.C.A. Moreira-Souza, C.L.C. Almeida-da-Silva, T.P. Rangel, G. da C. Rocha, M. Bellio, D.S. Zamboni, R.C. Vommaro, R. Coutinho-Silva, The P2X7 receptor mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through canonical NLRP3 inflammasome activation and reactive oxygen species production, *Front. Immunol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01257>.
- [34] M. Thiel, C.C. Caldwell, M. V. Sitkovsky, The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases, *Microbes Infect.* 5 (2003) 515–526. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00068-6).

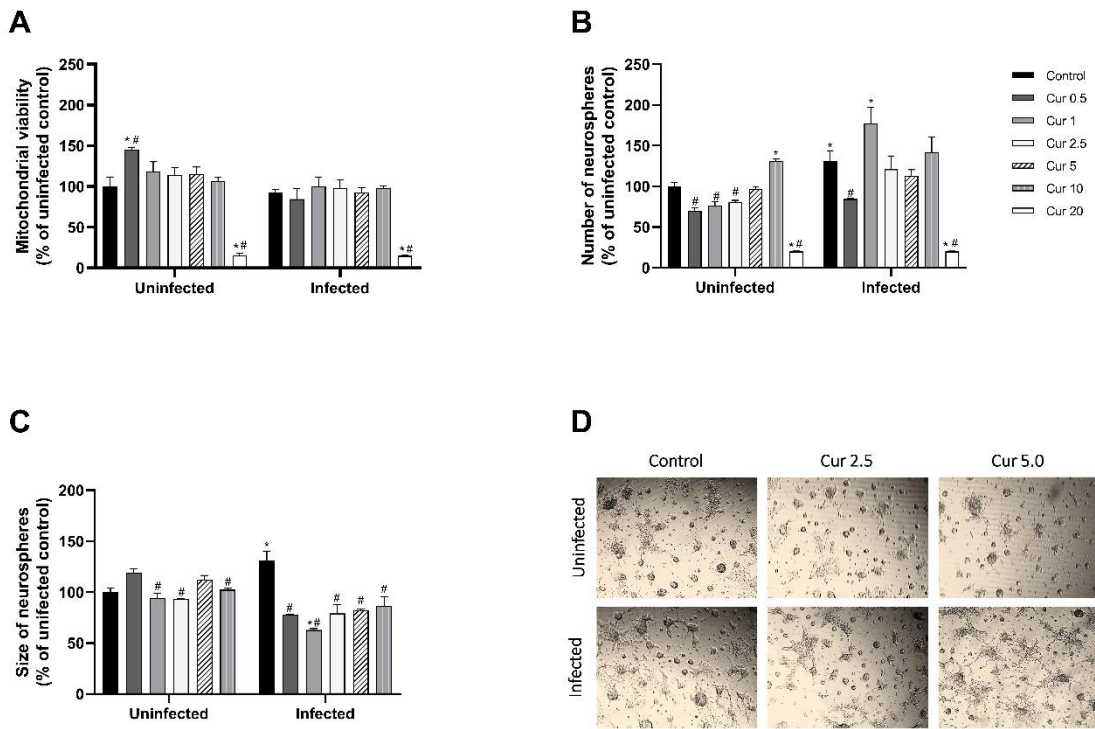


Fig. 1. Effects of curcumin on number and size of neurospheres. (A) Mitochondrial viability by MTT test. (B) Neurospheres count. (C) Size of neurospheres. (D) Illustration of neurospheres. Data are expressed as mean values \pm SEM; significant differences $P < 0.05$. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups).

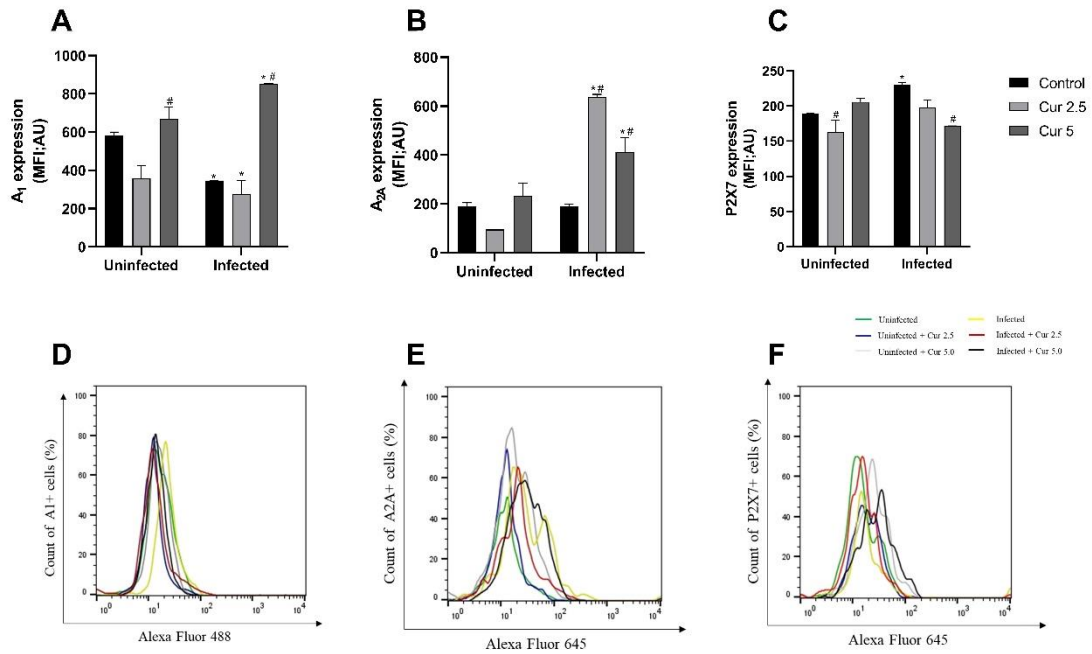


Fig. 2. Effect of curcumin on expression of purinergic receptors in toxoplasmosis infection.

Expression of A1 (A), A2A (B) and P2X7 (C) receptors. Flow cytometry histogram representative of A1 (D), A2A (E) and P2X7 (F) receptor expression. Data are expressed as mean values \pm SEM; significant differences $P < 0.05$. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups).

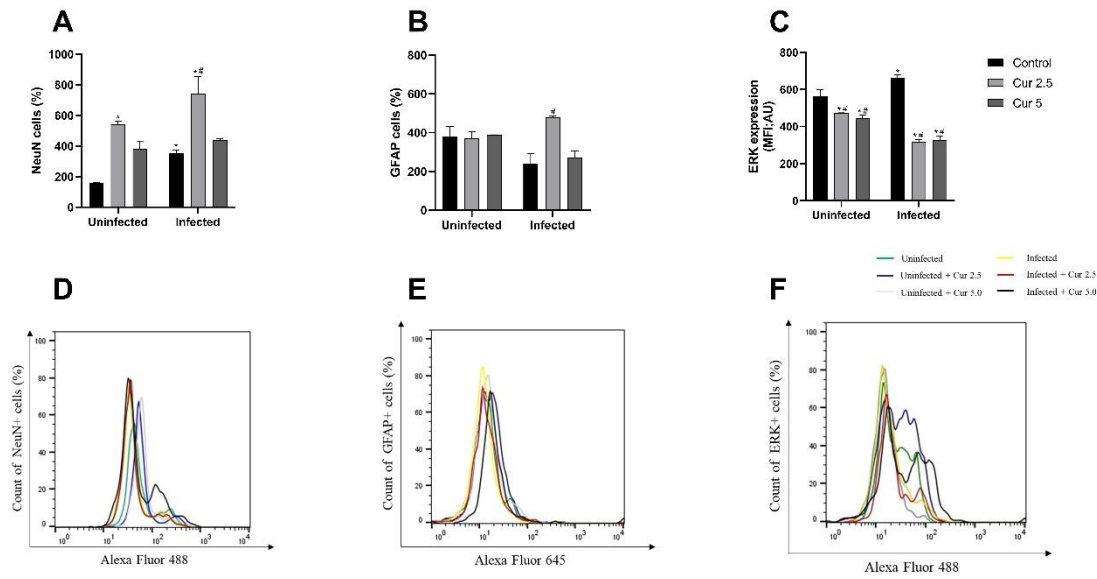
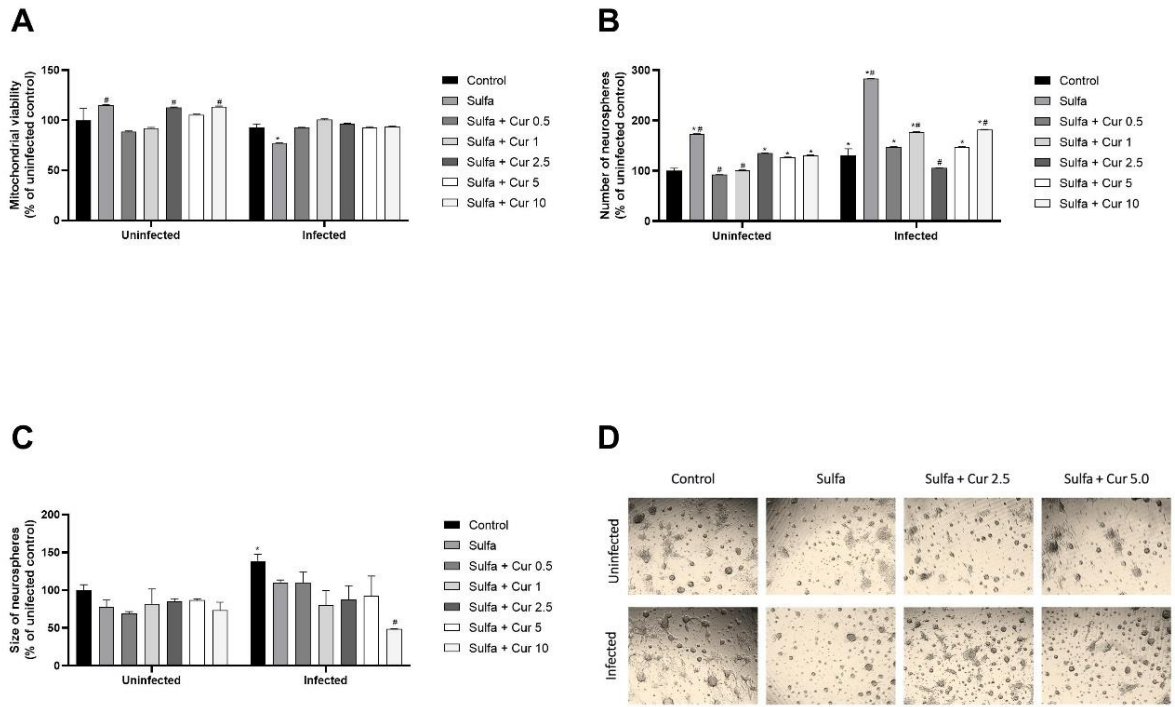


Fig. 3. Effect of curcumin on neurogliogenesis during *T. gondii* infection. Percentages of neuronal cells (A) and glial cells (B). Expression of ERK $\frac{1}{2}$ signaling pathway (C). Flow cytometry histogram representative of neuronal cells (D), differentiated and undifferentiated glial cells (E) and ERK $\frac{1}{2}$ expression signaling pathway (F). Data are expressed as mean values \pm SEM; significant differences $P < 0.05$. (*Uninfected vs experimental group) (# Infected vs experimental groups).



Supplemental material 1. Effect of sulfamethoxazole-trimethoprim (Sulfa) and combined action with curcumin on the number and size of neural precursor cells infected by *T. gondii*. (A) Mitochondrial viability by MTT test. (B) Neurosphere count. (C) Size of neurospheres. (D) Illustration of neurospheres.

4 DISCUSSÃO

O *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório de alta transmissibilidade e capacidade de invasão com cronificação no SNC. A alta dos dados epidemiológicos e a falta de medicamentos eficazes para a fase crônica são preocupantes, além da comprovada interferência do parasito neurogênese embrionária e adulta (BOTTARI et al., 2019a; DUBEY, 2014; DUNAY et al., 2018; HILL; DUBEY, 2018). A partir dessas problemáticas buscamos estudar a curcumina como um possível tratamento minimizador desses danos.

A curcumina é descrita por atuar benéficamente em doenças que comprometem o cérebro, atuando assim, com papel neuroprotetor (BHAT et al., 2019; DA COSTA et al., 2018; TIWARI et al., 2014; VAISERMAN; KOLIADA; LUSHCHAK, 2020; WEI et al., 2021). Apesar de até o momento apenas três estudos utilizarem a curcumina como alvo para toxoplasmose com resultados satisfatórios, dois deles a trazem com nanoformulações (AZAMI et al., 2018; EL-SHAFFEY et al., 2020; GOO et al., 2015).

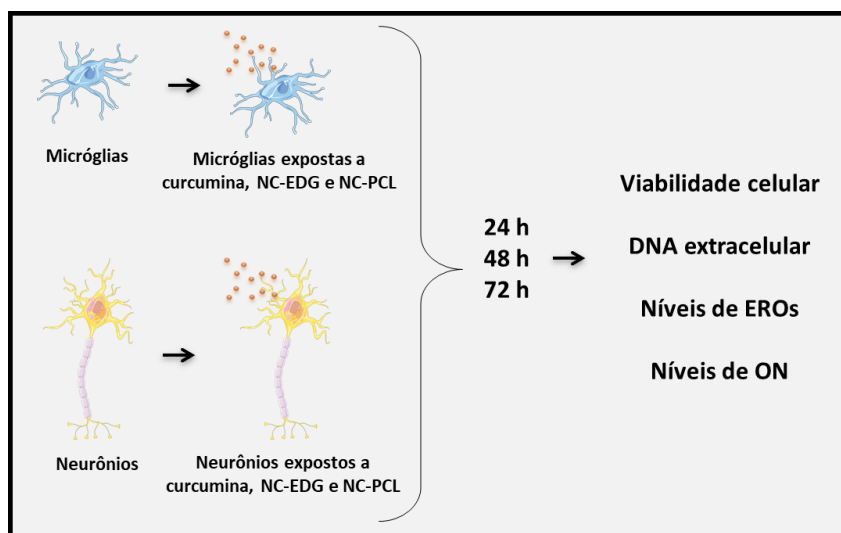
Muito se tem comprovado que a curcumina é uma terapia benéfica para doenças variadas, mas poucos estudam a segurança de seu uso de forma preventiva, em casos saudáveis e normais. É de extrema relevância o uso de testes *screening* avaliando a segurança desses produtos naturais, uma vez que a população em geral está fazendo uso indiscriminado e sem acompanhamento adequado. Apesar da curcumina estar classificada como segura e ser aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*), pesquisas vem revelando que este polifenol pode atuar de maneira maléfica, principalmente à via hepatobiliar, responsável pelo seu metabolismo, e sistema reprodutor (ANAND et al., 2007; BALAJI; CHEMPAKAM, 2010; BURGOS-MORÓN et al., 2010; GUPTA; PATCHVA; AGGARWAL, 2013; KÁDASI et al., 2017; LIN et al., 2021; MOREIRA-PINTO et al., 2020; QURESHI; SHAH; AGEEL, 1992; SANTOS, 2019). São escassos resultados de concentrações/doses em modelos de estudo saudáveis que apontem sua segurança e impacto a nível cerebral.

Tendo em vista a utilização da curcumina para o tratamento da toxoplasmose congênita e sabendo de sua possível toxicidade, priorizamos, antes de tudo, o estudo da curcumina e de duas nanocápsulas de curcumina, quanto sua segurança de uso e toxicidade. Pesquisas com concentrações seguras da curcumina, de nanocápsula de Eudragit® com curcumina (NC-EDG) e nanocápsula de poli-ε-caprolactona contendo curcumina (NC-PCL) não foram antes testadas *in vitro* com métodos preliminares, afim

de avaliar possíveis prejuízos na homeostase em células do SNC. Terapias que desequilíbrem de forma prejudicial o metabolismo celular, não são toleradas, uma vez que pesquisas por novas terapias devem prejudicar a doença, sem causar grandes efeitos colaterais nas células saudáveis que são imprescindíveis a um ser vivo.

Com isso, utilizamos duas linhagens celulares oriundas do SNC, SH-SY5Y (neurônios) e BV-2 (micróglia), que foram expostas à uma curva concentração de curcumina, NC-EDG e NC-PCL. A análise da citotoxicidade da curcumina e das duas nanocápsulas contendo curcumina foram determinadas pela viabilidade celular, conteúdo de DNA extracelular e níveis de EROs e ON para perfil oxidativo (Figura 13).

Figura 13 – Delineamento experimental para análise da segurança quanto ao uso da curcumina, NC-EDG e NC-PCL em células neurais.



Fonte: Autora.

É importante destacar que as preparações das duas nanocápsulas, NC-EDG e NC-PCL, apresentaram características físico-químicas satisfatórias, com eficiência de encapsulação, uniformidade de tamanho nanométrico e pH ácido devido a seus componentes de produção (GÜNDEL et al., 2018; JAGUEZESKI et al., 2019). De modo geral, a análise da exposição dos tratamentos às células neurais revela resultados que dependem de concentrações, tipo celular e tempo de exposição.

Para o teste de MTT, a curcumina diminuiu a viabilidade celular em células SH-SY5Y dependentemente da concentração, o que não foi observado para BV-2. Apenas algumas concentrações da NC-PCL alteraram a viabilidade, os resultados mais significativos são vistos para a NC-EDG, especialmente 10 e 20 μM . Em ambas as células estudadas quando expostas as nanocápsulas, dependendo do tempo de

exposição e da concentração, o conteúdo de DNA extracelular foi aumentado significativamente, sugerimos que este achado deve-se a interação dos polímeros constituintes com a membrana celular, aumentando sua permeabilidade para permitir a entrada do composto (UMERSKA et al., 2018; ZIELIŃSKA et al., 2020).

A característica da curcumina ser antioxidante está entre uma das propriedades que a fazem ter valor terapêutico. O estresse oxidativo é visualizado em distúrbios cerebrais, sendo que a produção de EROs e ON fazem parte do metabolismo fisiológico da célula, atuando também em situações patológicas na tentativa de eliminar o patógeno (HEWLINGS; KALMAN, 2017). Quanto à análise do perfil oxidativo, observamos que somente 20 μM da NC-EDG foi capaz de aumentar níveis de ON. Resultados mais significantes estão relacionados com a produção de EROs, uma vez que a curcumina diminui os níveis de EROs de maneira dependente da concentração, principalmente em 72h de exposição em ambas as células. Para as nanocápsulas de curcumina o desbalanço nos níveis de EROs é mais significativa ainda. Os mecanismos pelos quais a curcumina diminui ou aumenta os níveis de EROs é dependente do tipo celular e das condições experimentais, e envolve sua atividade antioxidante, que neutraliza-os (AYATI et al., 2019; CAMACHO-BARQUERO et al., 2007; HEWLINGS; KALMAN, 2017; LICZBIŃSKI; MICHAŁOWICZ; BUKOWSKA, 2020; TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019)

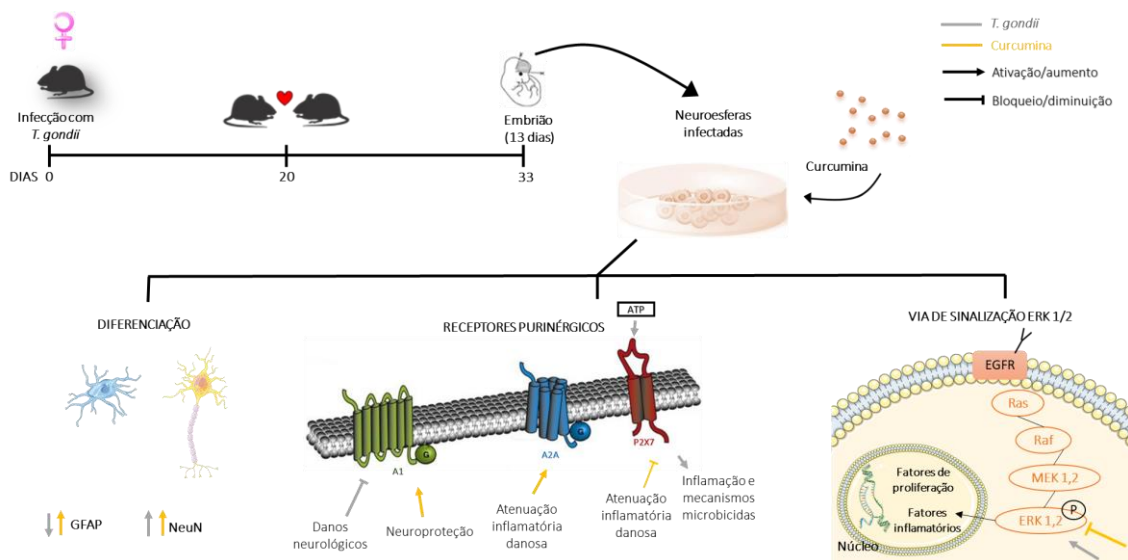
Neste estudo, demonstramos que 10 e 20 μM de curcumina, dependendo do tempo de exposição, foram prejudiciais às células, reduzindo a viabilidade celular. Em contrapartida, as concentrações intermediárias de curcumina apresentaram menor neurotoxicidade em comparação às mesmas concentrações de nanoformulações, pois obtiveram resultados estatísticos mais significativos quando comparadas ao controle negativo. Isso pode ser explicado pelo fato de as nanoformulações possuírem componentes que geram citotoxicidade, entre eles o tensoativo polissorbato 80 (ZIELIŃSKA et al., 2020).

Nossos resultados para as concentrações seguras de uso da curcumina *in vitro* estão de acordo com os utilizados para tratar doenças que afetam o SNC, por exemplo, a curcumina em células SH-SY5Y nas concentrações de 1, 2,5 e 5 μM agiu positivamente diminuindo o estresse oxidativo em um modelo doença neurodegenerativa (XIANG et al., 2020). Mursaleen e colaboradores utilizaram-se de uma nanoformulação de curcumina (5 μM) contra a neurotoxicidade induzida por rotenona em células SH-SY5Y (MURSALEEN; SOMAVARAPU; ZARIWALA, 2020).

Portanto, concentrações 1 – 5 μM não são prejudiciais às células saudáveis, mas a concentração de curcumina e o tempo de exposição são fatores indutores de desequilíbrio na homeostase celular, principalmente 10 e 20 μM de curcumina. No entanto, devido às desvantagens da substância na forma livre, nanoformulações nas mesmas concentrações ou até as menores podem trazer resultados mais satisfatórios ao controlar a liberação da curcumina e aumentar sua biodisponibilidade, além de cruzar a BHE e atingir os locais de lesões cerebrais (DEL PRADO-AUDELO et al., 2019; RAKOTOARISOA; ANGELOVA, 2018; SADEGH MALVAJERD et al., 2019).

A partir dos resultados obtidos destacamos que as concentrações acima sugeridas não alteraram o metabolismo celular normal, podendo ser utilizadas como terapia em modelos de doenças cerebrais. Com isso, nosso próximo passo foi seguir estudando a curcumina livre frente as alterações da toxoplasmose na neurogênese embrionária, possibilitando estudos futuros com as nanoformulações de curcumina. O conjunto de resultados obtidos no protocolo de infecção congênita com *T. gondii* na neurogênese embrionária (manuscrito) foram reunidos na figura 14.

Figura 14 – Modulação da curcumina e do *T. gondii*, *in vitro*, na diferenciação neurônio-gliial, na expressão de receptores purinérgicos e na via de sinalização ERK 1/2.



Fonte: Autora.

Como anteriormente descrito, o parasito *T. gondii* é capaz de atravessar membranas biológicas, como a BHE e placentária (MENDEZ; KOSHY, 2017). Na presente pesquisa, objetivamos a infecção materno fetal do parasita utilizando a cepa cistogênica VEG em camundongos fêmeas.

A cultura de CPNs retiradas do telencéfalo de embriões de camundongos foi escolhida como método para a análise da influência de componentes externos durante a neurogênese, como *T. gondii* e curcumina. Durante a neurogênese, o parasito consegue invadir CPNs, causando alterações no crescimento celular, na migração e diferenciação, portanto, comprometendo o desenvolvimento normal do cérebro (BOTTARI et al., 2019a; PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015). Verificamos que a quantidade e o tamanho das neuroesferas foram aumentadas durante a infecção, estando de acordo com outros estudos, afirmando que de acordo com o tipo celular e da cepa utilizada, o parasito pode tanto inibir ou ativar a apoptose e o aumento de tamanho deve-se a invasão do parasito formando vacúolos parasitários para a sua cronificação (BOTTARI et al., 2019a; CONTRERAS-OCHOA et al., 2013; HOWE; SIBLEY, 1995).

Proteínas expressas em células envolvidas no processo de diferenciação neural permitem utilizar a metodologia de imunocitoquímica para a detecção da quantidade de células diferenciadas e identificá-las, por isso a análise de células GFAP⁺ e NeuN⁺ foi determinada para a marcação de células gliais e neurônios, respectivamente. Os resultados indicaram que o parasito estimula a neurogênese sem alterações na gliogênese, não estando de acordo com outro achado científico (BOTTARI et al., 2019a). Acreditamos que a preferência do parasito por macrófagos do que neurônios, impacta em sua sobrevivência, possibilitando um estímulo exacerbado para a neurogênese diante da perda de células gliais (BOTTARI et al., 2019a; MENDEZ; KOSHY, 2017; PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015). Apenas as células gliais infectadas conseguem agir a fim de combater e provocar morte do parasita ou são mortos diante da infecção, possibilitando que os neurônios sejam a célula hospedeira primária para a infecção persistente. Alternativamente, o *T. gondii* poderia interagir primariamente com os neurônios *in vivo*, o que significa que o *T. gondii* persiste nos neurônios, porque essas são as células com as quais o parasito interage predominantemente (GOMES; BARBOSA, 2017; PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015).

A exposição de 20 µM de curcumina nas CPNs não infectadas e infectadas gerou grave perda da viabilidade celular, bem como diminuição de quantidade de neuroesferas. Concentrações de 2,5 e 5 µM foram capazes de atuar beneficemente restaurando o tamanho das CPNs infectadas, sem causar perda de viabilidade de células saudáveis, assim sendo escolhidas para os próximos testes. Com isso, apenas

2,5 μ M de curcumina restaurou a gliogênese em CPNs infectadas, mas não alterou a neurogênese, desencadeando uma maior expressão de células NeuN⁺, que já era observada em CPNs não infectadas.

Sabendo da participação essencial do sistema purinérgico no desenvolvimento embrionário e diferenciação neural, bem como sua modulação na infecção parasitária do *T. gondii* (CORRÊA et al., 2010; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; TRUJILLO et al., 2012), investigamos como o sistema purinérgico seria afetado durante a interação do parasita com CPNs no modelo de toxoplasmose congênita e como a curcumina poderia atuar com papel terapêutico. Para isso, foram estudados a expressão dos receptores purinérgicos A1, A2A e P2X7, relacionando-os com defesa imunológica, mecanismos de morte parasitária, atenuação inflamatória e neuroproteção.

A expressão dos receptores A2A e P2X7 desempenham um papel central na resposta imune contra o *T. gondii*, por modular a produção de citocinas inflamatórias. Durante a invasão do parasito em células imunes, ocorre a liberação de eATP, assim ativando receptor P2X7 responsável por desenvolver mecanismos antiparasitários para a morte do parasito (CORRÊA et al., 2010; MOREIRA-SOUZA et al., 2017). Em nossos resultados, observamos que o parasito ativa P2X7 das neuroesferas e a utilização da curcumina age regulando a inflamação exacerbada, atuando com sua já comprovada propriedade anti-inflamatória. Apesar da ativação do P2X7 na infecção, não observamos a atuação do receptor A2A nesse sentido, apenas o uso da curcumina conseguiu ativar esse receptor purinérgico, relacionado ao controle neuroinflamatório e redução do dano tecidual (THIEL; CALDWELL; SITKOVSKY, 2003). A proteção neurológica é comprovadamente afetada pelo *T. gondii*, devido ao nosso achado de diminuição na expressão do receptor A1 em neuroesferas infectadas, mas o uso da curcumina conseguiu atuar como neuroprotetor, ativando A1.

A via de sinalização das MAPK foi também alvo de estudo nesta dissertação. Durante a invasão celular, os parasitos ativam a via das proteínas ativadoras de mitógenos ERK, P38 e JNK, que foi confirmado em nosso estudo pelo aumento na expressão de ERK ½ em neuroesferas infectadas (VALÈRE et al., 2003). A ativação está relacionada à proliferação celular, que foi anteriormente observada pela alteração na quantidade de células, além de que a inflamação, desencadeada pelo P2X7 na infecção, também pode ser correlacionada com ativação de ERK ½. A curcumina

conseguiu reverter os efeitos prejudiciais do parasito, restaurando a quantidade celular e atenuando a inflamação por inibir a fosforilação e ativação desta via.

O estudo dos mecanismos que desencadeiam as alterações na diferenciação neural, nas vias de sinalização, ativação ou inibição de receptores são de extrema importância para escolha de terapias que atuem modulando os mesmos caminhos, a fim de minimizar os prejuízos de uma infecção congênita por toxoplasmose. De forma geral, nossos resultados apresentam-se promissores para a utilização da curcumina como terapia minimizadora ou até restauradora dos danos, uma vez que reestabeleceu o número e tamanho das CPNs e proporcionou importante papel neuroprotetor e anti-inflamatório, além da notável modulação da via ERK $\frac{1}{2}$.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo verificou que a análise básica e preliminar da segurança de uso da curcumina, NC-EDG e NC-PCL em cultivo de duas linhagens celulares neurais:

1) A toxicidade de ambas depende totalmente da linhagem celular, da concentração e tempo de exposição;

2) As concentrações de 10 e 20 μM de curcumina são mais danosas às células neurais causando perda da viabilidade;

3) Curcumina apresentou resultados mais seguros que as nanocápsulas, acreditamos que devido aos componentes das nanoformulações apresentarem neurotoxicidade;

4) A comparação das duas nanoformulações demonstrou que NC-EDG obteve resultados mais significativos no não mantimento da homeostase celular quando comparada à NC-PCL, mas o seu uso *in vivo* dependerá da escolha da via de administração;

5) As concentrações entre 1-5 μM , da curcumina, NC-PCL e NC-EDG, podem ser usadas em modelos *in vitro* de doenças cerebrais, pois não afetam consideravelmente a homeostase celular.

Para o protocolo de neurogênese embrionária em camundongos infectados congenitamente com *T. gondii* verificamos que:

6) A interferência do *T. gondii* na diferenciação neural ocorreu pela promoção do aumento na viabilidade e no tamanho de CPNs, com favorecimento da neurogênese e não gliogênese. No entanto, a curcumina conseguiu restaurar a gliogênese e aumentar ainda mais a neurogênese, com recuperação do tamanho das CPNs;

7) A infecção por *T. gondii* induziu a superexpressão do receptor P2X7, responsável pelo recrutamento do sistema imune no intuito de defesa contra o patógeno com o desenvolvimento de mecanismos microbicidas. A curcumina atenuou a expressão do P2X7 impedindo resposta imune excessiva;

8) Apesar de não haver diferenças na expressão do receptor purinérgico A2A entre CPNs não infectadas e infectadas, a curcumina superexpressou A2A agindo com seu papel anti-inflamatório, impedindo danos teciduais por respostas imunes excessivas;

9) A expressão diminuída do receptor A1 indica perda da neuroproteção durante uma infecção por *T. gondii*, mas o uso da curcumina reverteu esse efeito;

10) A via de sinalização ERK $\frac{1}{2}$ é ativada durante a doença parasitária para a produção de mediadores inflamatórios e proliferação celular. Em contrapartida, a curcumina diminuiu sua expressão, regulando as respostas pro-inflamatórias *versus* anti-inflamatórias e de proliferação *versus* apoptose;

11) A curcumina agiu com importante função neuroprotetora e anti-inflamatória, via receptores purinérgicos e ERK $\frac{1}{2}$, com intuito de prevenir os danos causados na toxoplasmose congênita, possibilitando seu uso terapêutico.

6 PERSPECTIVAS

Nossos resultados apresentaram-se promissores quanto ao entendimento de alterações provocadas pelo *T. gondii* na neurogênese embrionária, relacionando sua interferência também com o sistema purinérgico, além do destaque aos referidos efeitos benéficos da curcumina frente ao nosso objetivo.

Com isso, futuramente será analisado a atividade de enzimas purinérgicas, o ciclo celular e a migração de CPNs, bem como a associação do sulfametoxazol (medicamento padrão) com a curcumina, seguindo as mesmas metodologias *in vitro* aqui descritas, com o intuito complementar e elucidar ainda mais os resultados dessa dissertação.

REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19–29, 2009.
- AGGARWAL, B. et al. Curcumin: The Indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 1–75, 2007.
- AIMONE, J. B. et al. Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 991–1026, out. 2014.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Toxoplasma gondii Infection and Depression: A Case—Control Seroprevalence Study. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 6, n. 2, p. 85–89, 2016.
- ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceuticals**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 1 maio 2007.
- ANTCZAK, M.; DZITKO, K.; DŁUGOŃSKA, H. Human toxoplasmosis—Searching for novel chemotherapeutics. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 677–684, 2016.
- ASHOUR, D. Toxoplasma gondii: A Journey into the Brain. **Acta Scientific Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 72–73, 1 abr. 2018.
- AYATI, Z. et al. Ethnobotany, Phytochemistry and Traditional Uses of Curcuma spp. and Pharmacological Profile of Two Important Species (C. longa and C. zedoaria): A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 8, p. 871–935, 2019.
- AZAMI, S. J. et al. Curcumin nanoemulsion as a novel chemical for the treatment of acute and chronic toxoplasmosis in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 7363–7374, 2018.
- BAGHERI, H. et al. Effects of curcumin on mitochondria in neurodegenerative diseases. **BioFactors**, v. 46, n. 1, p. 5–20, 2020.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003.
- BAK, J. et al. The association between suicide attempts and toxoplasma gondii infection. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 95–102, 2018.
- BALAJI, S.; CHEMPAKAM, B. Toxicity prediction of compounds from turmeric (Curcuma longa L). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2951–2959, 2010.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of Toxoplasma gondii across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426–430, 2003.
- BERESWILL, S. et al. Anti-inflammatory effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in acute small intestinal inflammation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.
- BHAT, A. et al. Benefits of curcumin in brain disorders. **BioFactors**, v. 45, n. 5, p. 666–689, 2019.

- BISCHOFF, A. R. et al. Incidência de toxoplasmose congênita no período de 10 anos em um hospital universitário e frequência de sintomas nesta população. **Artigo Original Incidência**, v. 04, n. 2, p. 38–44, 2014.
- BOEING, H. et al. Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637–663, 2012.
- BOKSA, P. Brain , Behavior , and Immunity Effects of prenatal infection on brain development and behavior : A review of findings from animal models. **Brain Behavior and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.
- BOLDRINI, M. et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 4, p. 589–599, abr. 2018.
- BOTTARI, N. B. et al. Resveratrol as a Therapy to Restore Neurogliogenesis of Neural Progenitor Cells Infected by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 2328–2338, 2019a.
- BOTTARI, N. B. et al. Resveratrol-mediated reversal of changes in purinergic signaling and immune response induced by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells. **Purinergic Signalling**, v. 15, n. 1, p. 77–84, 2019b.
- BOTTARI, N. B. et al. Neuroprotective role of resveratrol mediated by purinergic signalling in cerebral cortex of mice infected by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 119, n. 9, p. 2897–2905, 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo de notificação e investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita**. v. 1, 2018.
- BREWER, G. J.; TORRICELLI, J. R. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. **Nature Protocols**, v. 2, n. 6, p. 1490–1498, 2007.
- BURGOS-MORÓN, E. et al. The dark side of curcumin. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 1771–1775, 2010.
- BURNSTOCK, G. Historical review : ATP as a neurotransmitter. v. 27, n. 3, 2006.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 1, p. 3–8, 2009.
- BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 1–10, 6 jan. 2018.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, n. SPEC.ISS., p. 31–304, 2004.
- BURNSTOCK, G.; ULRICH, H. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 8, p. 1369–1394, 2011.
- BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. **Acta Physiologica**, v. 195, n. 4, p. 415–447, 2009.

CAMACHO-BARQUERO, L. et al. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 3, p. 333–342, 2007.

CDC. Centers for disease control and prevention. **Toxoplasmosis (Toxoplasma infection)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/>>. 2020.

CHEGENI, T. N. et al. Relationship between toxoplasmosis and obsessive compulsive disorder: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, 2019.

CHERAGHIPOUR, K. et al. Antiparasitic properties of curcumin: A review. **AIMS Agriculture and Food**, v. 3, n. 4, p. 561–578, 2018.

COMA-CROS, E. M. et al. Antimalarial activity of orally administered curcumin incorporated in eudragit®-containing liposomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1–11, 2018.

CONTRERAS-OCHOA, C. O. et al. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 256–265, 2013.

CORRÊA, G. et al. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 6, p. 497–504, 2010.

CORRÊA, G. et al. Inflammatory early events associated to the role of P2X7 receptor in acute murine toxoplasmosis. **Immunobiology**, v. 222, n. 4, p. 676–683, 2017.

COSTA-JUNIOR, H. M. et al. Lipid metabolism modulation by the P2X7 receptor in the immune system and during the course of infection: New insights into the old view. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 4, p. 381–392, 2011.

COSTA, M. R.; JAGASIA, R.; BERNINGER, B. Chapter 2- Directed Neuronal Differentiation of Embryonic. 2009.

COSTA, R. C. DE B. Aspectos biológicos, epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico do *Toxoplasma gondii*. p. 27, 2013.

COUTINHO-SILVA, R. et al. The P2X7 receptor and intracellular pathogens: A continuing struggle. **Purinergic Signalling**, v. 5, n. 2, p. 197–204, 2009.

COUTINHO-SILVA, R.; SAVIO, L. E. B. Purinergic signalling in host innate immune defence against intracellular pathogens. **Biochemical Pharmacology**, p. 1–8, 2021.

DA COSTA, I. M. et al. Supplementation with Curcuma longa Reverses Neurotoxic and Behavioral Damage in Models of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 5, p. 406–421, 2018.

DE GARCIA, S.M.L; FERNÁNDEZ, C.G. Embriologia, Artmed: 3ª ed. POA, 2012.

DEL PRADO-AUDELO, M. L. et al. Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 1–28, 2019.

DEL PUERTO, A.; WANDOSELL, F.; GARRIDO, J. J. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 1–15, 2013.

DENDE, C. et al. Simultaneously targeting inflammatory response and parasite sequestration in brain to treat Experimental Cerebral Malaria. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.

DENOTH-LIPPUNER, A.; JESSBERGER, S. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 223–236, 2021.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system : A signal of danger for dendritic cells. p. 205–209, 2005.

DUBEY, J. P. et al. **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology**. v. 139, n. 11, p 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P. **Cap 1 - The History and Life Cycle of Toxoplasma gondii**. Elsevier, 2014.

DUNAY, I. R. et al. Treatment of Toxoplasmosis : Historical Perspective , Animal. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 31, n. 4, p. 1–33, 2018.

EL-SHAFFEY, A. A. M. et al. Curcumin@metal organic frameworks nano-composite for treatment of chronic toxoplasmosis. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, n. 11, 2020.

EL SAFTAWY, E. A. et al. Can *Toxoplasma gondii* Pave the Road for Dementia? **Journal of Parasitology Research**, 2020.

ELAMIN, M. et al. Anti-proliferative and apoptosis induction activities of curcumin on *Leishmania major*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 53, n. 3, p. 240–247. 2021.

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

ERIKSSON, P. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**. v. 4, n. 11, p. 1313–1317, 1998.

FAN, C. et al. Neuroprotective effects of curcumin on IL-1 β -induced neuronal apoptosis and depression-like behaviors caused by chronic stress in rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–17, 2019.

FARKAS, L. M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 6, p. 707–715, 2008.

FERREIRA, A. 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 and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 131–142, jun. 2004.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. DE. Toxoplasmosis animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 1, 2018.

FRACASSO, M. et al. *Trypanosoma evansi* impacts on embryonic neural progenitor cell functions. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, 2019.

FREDHOLM, B. B. et al. VI. Nomenclature and classification of purinoreceptors. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n.2, p. 143-156, 1994.

GLASER, T. et al. Modulation of mouse embryonic stem cell proliferation and neural differentiation by the P2X7 receptor. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

GOMES, A. F.; BARBOSA, H. S. Congenital Toxoplasmosis: In Vivo Impact of Toxoplasma gondii Infection on Myogenesis and Neurogenesis. **Toxoplasmosis**, 2017.

GONÇALVEZ, T. J.; SCHAFFER, S. T.; GAGE, F. H. Review Adult Neurogenesis in the Hippocampus : From Stem Cells to Behavior. p. 897–914, 2016.

GONZÁLEZ-PONCE, H. et al. Natural Dietary Pigments: Potential mediators against hepatic damage induced by over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drugs. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 117, 2018.

GOO, Y. K. et al. Characterization of Toxoplasma gondii glyoxalase 1 and evaluation of inhibitory effects of curcumin on the enzyme and parasite cultures. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015.

GRIMM, I.; ULLSPERGER, S. N.; ZIMMERMANN, H. Nucleotides and epidermal growth factor induce parallel cytoskeletal rearrangements and migration in cultured adult murine neural stem cells. **Acta Physiologica**, v. 199, n. 2, p. 181–189, 2010.

GÜNDEL, S. S. et al. Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 378–383, 1 ago. 2018.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. **AAPS Journal**, v. 15, n. 1, p. 195–218, 2013.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, F. et al. Curcumin alters the cytoskeleton and microtubule organization on trophozoites of Giardia lamblia. **Acta Tropica**, v. 172, p. 113–121, 1 ago. 2017.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Foodborne Parasites. **Foodborne Parasites**, 2018.

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.

HUANG, S. W. et al. P2X7 receptor-dependent tuning of gut epithelial responses to infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, n. 2, p. 178–188, 2017.

HUTTON, S. R.; PEVNY, L. H. Isolation, culture, and differentiation of progenitor cells from the central nervous system. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 11, p. 1–6, 2008.

- JAGUEZESKI, A. M. et al. Low-dose curcumin-loaded Eudragit L-100-nanocapsules in the diet of dairy sheep increases antioxidant levels and reduces lipid peroxidation in milk. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 1–14, 2019.
- JASIM, M. E. Study the effect of alcoholic extract of (Turmeric plant (curcumin longa)) on growth of leishmania donovani promastigotes in vitro. **International Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 365–370, 2020.
- JIN, K. et al. Neurogenesis and aging : FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. **Aging Cell**, v.2 p. 175–183, 2003.
- KÁDASI, A. et al. Direct effect of curcumin on porcine ovarian cell functions. **Animal Reproduction Science**, v. 182, n. February, p. 77–83, 2017.
- KAPLAN, J.E.; BENSON, C.; HOLMES, K.K.; BROOKS, J.T.; PAU, A.; MASUR, H. Centers for Disease Control Prevention (CDC), National Institutes of Health, HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **MMWR Recomm**, v.58, n.4, p.1–207, 2009.
- KATSETOS, C. D. et al. Class III β -tubulin isotype: A key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. **Journal of Child Neurology**, v. 18, n. 12, p. 851–866, 2003.
- KHAN, K.; KHAN, W. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. **Parasitology International**, v. 67, n. 6, p. 715–721, 2018.
- KIM, K. K.; ADELSTEIN, R. S.; KAWAMOTO, S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31052–31061, 2009.
- KIM, S. K.; BOOTHROYD, J. C. Stage-Specific Expression of Surface Antigens by *Toxoplasma gondii* as a Mechanism to Facilitate Parasite Persistence . **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8038–8048, 2005.
- KRIEGSTEIN, A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 149–184, 1 jun. 2009.
- LEES, M. P. et al. P2X 7 Receptor-Mediated Killing of an Intracellular Parasite, *Toxoplasma gondii* , by Human and Murine Macrophages . **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7040–7046, 2010.
- LICZBIŃSKI, P.; MICHAŁOWICZ, J.; BUKOWSKA, B. Molecular mechanism of curcumin action in signaling pathways: Review of the latest research. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 8, p. 1992–2005, 2020.
- LIN, J. et al. Dev. Biol. **Trends Cell Biol.**, 2008.
- LIN, Z. et al. Curcumin mediates autophagy and apoptosis in granulosa cells: a study of integrated network pharmacology and molecular docking to elucidate toxicological mechanisms. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1–13, 2021.

LOPES, F. M. R. et al. Toxoplasma gondii infection in pregnancy. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 496–506, 2007.

LOVISON, R.; RODRIGUES, R. M. Incidência E Prevalência Da Toxoplasmose Na Região Sul Do Brasil : Revisão Bibliográfica. **Rev. Saúde Públ. Santa Cat**, v. 10, n. 3, p. 61–75, 2017.

MA, C. et al. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. **Behavioural Brain Research**, v. 317, p. 332–339, 2017.

MAHAMED, D. A. et al. CD73-generated adenosine facilitates Toxoplasma gondii differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 40, p. 16312–16317, 2012.

MAHAMED, D. A.; TOUSSAINT, L. E.; BYNOE, M. S. CD73-generated adenosine is critical for immune regulation during Toxoplasma gondii infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 2, p. 721–729, 2015.

MAITI, P.; DUNBAR, G. Use of Curcumin, a Natural Polyphenol for Targeting Molecular Pathways in Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1637, 31 maio 2018.

MARCOS, A. C. et al. Toxoplasma gondii infection impairs radial glia differentiation and its potential to modulate brain microvascular endothelial cell function in the cerebral cortex. **Microvascular Research**, v. 131, p. 104024, 2020.

MENDEZ, O. A.; KOSHY, A. A. Toxoplasma gondii: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 7, p. 1–12, 2017.

METZGER, J. J.; SIMUNOVIC, M.; BRIVANLOU, A. H. Synthetic embryology: controlling geometry to model early mammalian development. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 52, p. 86–91, 2018.

MIGITA, H. et al. Activation of adenosine A1 receptor-induced neural stem cell proliferation via MEK/ERK and Akt signaling pathways. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 13, p. 2820–2828, 2008.

MILLER, C. M. et al. Lack of a functioning P2X7 receptor leads to increased susceptibility to toxoplasmic ileitis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2015.

MISHRA, S. K. et al. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: Synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. **Development**, v. 133, n. 4, p. 675–684, 2006.

MOORE, K. L. Embriologia Básica, 8ª edição, 2013.

MORAIS, E. R. et al. Effects of curcumin on the parasite Schistosoma mansoni: A transcriptomic approach. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 187, n. 2, p. 91–97, 2013.

MOREIRA-PINTO, B. et al. Dissimilar effects of curcumin on human granulosa cells: Beyond its anti-oxidative role. **Reproductive Toxicology**, v. 95, p. 51–58, 2020.

MOREIRA-SOUZA, A. C. A. et al. The P2X7 receptor mediates Toxoplasma gondii Control in Macrophages through canonical NLRP3 inflammasome activation and

reactive oxygen species production. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

MOREIRA-SOUZA, A. C. A. et al. Disruption of Purinergic Receptor P2X7 Signaling Increases Susceptibility to Cerebral Toxoplasmosis. **American Journal of Pathology**, v. 189, n. 4, p. 730–738, 2019.

MOSTARDEIRO, V.B. **Efeitos do ácido clorogênico na modulação da sinalização purinérgica e perfil inflamatório em células microgлияis expostas ao lipopolissacarídeo**. 2021. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2021.

MUOTRI, A. R.; GAGE, F. H. Generation of neuronal variability and complexity. **Nature**, v. 441, 2006.

MURSALEEN, L.; SOMAVARAPU, S.; ZARIWALA, M. G. Deferoxamine and Curcumin Loaded Nanocarriers Protect Against Rotenone-Induced Neurotoxicity. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 10, n. 1, p. 99–111, 2020.

NAMGYAL, D. et al. The neuroprotective effect of curcumin against Cd-induced neurotoxicity and hippocampal neurogenesis promotion through CREB-BDNF signaling pathway. **Toxicology**, v. 442, n. July, p. 152542, 2020.

NEARY, J. T.; ZIMMERMANN, H. Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 4, p. 189–198, 2009.

OBERNIER, K.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. **Development (Cambridge)**, v. 146, n. 4, 2019.

OLIVEIRA, Á.; ILLES, P.; ULRICH, H. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 272–281, 2016.

OLIVEIRA, S. L. B. et al. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. **Cytometry Part A**, v. 83 A, n. 1, p. 76–89, 2013.

PALMER, T. D.; WILLHOITE, A. R.; GAGE, F. H. Vascular Niche for Adult Hippocampal. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 494, p. 479–494, 2000.

PARLOG, A.; SCHLÜTER, D.; DUNAY, I. R. Toxoplasma gondii-induced neuronal alterations. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 3, p. 159–170, 2015.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 214–223, 2007.

PORTER, S. B.; SANDE, M. A. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 1643–1648, 1992.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade Nanoemulsions formulated for topical use: a study of synthesis and toxicity. **Fitos**, v. 14, n. 4, p. 513–527, 2020.

QUAN, J. H. et al. P2X7 receptor mediates NLRP3-dependent IL-1 β secretion and parasite proliferation in Toxoplasma gondii-infected human small intestinal epithelial cells. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

- QURESHI, S.; SHAH, A. H.; AGEEL, A. M. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. **Planta Medica**, v. 58, n. 2, p. 124–127, 1992.
- RAKOTOARISOA, M.; ANGELOVA, A. Amphiphilic Nanocarrier Systems for Curcumin Delivery in Neurodegenerative Disorders. **Medicines**, v. 5, n. 4, p. 126, 2018.
- RATHBONE, M. P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, 1999.
- REICHERT, K. P. et al. Aluminum affects neural phenotype determination of embryonic neural progenitor cells. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 9, p. 2515–2524, 2019.
- REMYINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941–945, 2004.
- RIBEIRO, D. E. et al. Purinergic receptors in neurogenic processes. **Brain Research Bulletin**, v. 151, n. November 201, p. 3–11, 2019.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.
- RODRIGUES, R. J.; MARQUES, J. M.; CUNHA, R. A. Seminars in Cell & Developmental Biology Purinergic signalling and brain development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2018.
- SADEGH MALVAJERD, S. et al. Brain Delivery of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Optimization, and Pharmacokinetic Evaluation. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 728–739, 2019.
- SAID, D. E.; ELSAMAD, L. M.; GOHAR, Y. M. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 545–554, 2012.
- SAKI, J. et al. Curcumin as an indirect methylation inhibitor modulates the effects of *Toxoplasma gondii* on genes involved in male fertility. **EXCLI journal**, v. 19, p. 1196–1207, 2020.
- SANTA MARIA. Secretaria Municipal de Saúde de Santa Maria. **Relatório de investigação epidemiológico do surto de toxoplasmose**. Santa Maria, 2018. Disponível em: <<http://www.santamaria.rs.gov.br/docs/noticia/2018/10/D19-1566.pdf>>. acesso em 21 de dezembro de 2021.
- SANTOS, T. **Efeitos da curcumina em parâmetros hepáticos e reprodutivos de camundongos swiss fêmeas saudáveis**. 2019. 68 f. Tese (Doutorado em Biologia celular e estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.
- SAWADA, K. et al. Identification of a vesicular nucleotide transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 15, p. 5683–5686, 2008.
- SERPA GUERRA, A. M. et al. The nanotech potential of turmeric (*Curcuma longa* L.)

in food technology: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 11, p. 1842–1854, 2020.

SHOHAYEB, B. et al. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. **Translational Neurodegeneration**, p. 1–19, 2018.

SOLEIMANI, V.; SAHEBKAR, A.; HOSSEINZADEH, H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 6, p. 985–995, 2018.

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1219, 2013.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

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

THIEL, M.; CALDWELL, C. C.; SITKOVSKY, M. V. The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 515–526, 2003.

TIWARI, S. K. et al. Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/ β -catenin pathway. **ACS Nano**, v. 8, n. 1, p. 76–103, 2014.

TOMEH, M. A.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1033, 2019.

TRUJILLO, C. A. et al. Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 53, p. 44046–44061, 2012.

UMERSKA, A. et al. Polymeric nanoparticles for increasing oral bioavailability of Curcumin. **Antioxidants**, v. 7, n. 4, p. 46, 2018.

URBACH, A.; WITTE, O. W. Divide or Commit – Revisiting the Role of Cell Cycle Regulators in Adult Hippocampal Neurogenesis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. April, p. 1–22, 2019.

VAISERMAN, A.; KOLIADA, A.; LUSHCHAK, O. Neuroinflammation in pathogenesis of Alzheimer's disease: Phytochemicals as potential therapeutics. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 189, p. 111259, 2020.

VALÈRE, A. et al. Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. **Parasite**, v. 10, n. 1, p. 59–64, 2003.

WANG, T. et al. *Toxoplasma gondii* induce apoptosis of neural stem cells via endoplasmic reticulum stress pathway. **Parasitology**, v. 141, n. 7, p. 988–995, 2014.

WANG, Z. et al. A curcumin derivative activates TFEB and protects against parkinsonian neurotoxicity in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v.

21, n. 4, p. 1515, 2020.

WEI, W. et al. Dichloroacetic acid-induced dysfunction in rat hippocampus and the protective effect of curcumin. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, p. 545–556, 2021.

WISLET-GENDEBIEN, S. et al. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 16, p. 3295–3302, 2003.

XIANG, B. et al. Curcumin Ameliorates Copper-Induced Neurotoxicity Through Inhibiting Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis in SH-SY5Y Cells. **Neurochemical Research**, v. 46, p. 367–378, 2020.

XIAO, J. et al. Toxoplasma gondii: Biological Parameters of the Connection to Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 44, n. 5, p. 983–992, 2018.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109–121, 2014.

ZAKI, S. M. et al. Nano-curcumin versus curcumin in amelioration of deltamethrin-induced hippocampal damage. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 2, p. 157–175, 2020.

ZHANG, J. et al. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells. **Molecular Immunology**, v. 116, n. May, p. 29–37, 2019.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645–660, 2008.

ZHENG, J. et al. Curcumin, a polyphenolic curcuminoid with its protective effects and molecular mechanisms in diabetes and diabetic cardiomyopathy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–10, 2018.

ZIELIŃSKA, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3731, 2020.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 49, p. 589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Nucleotide signaling in nervous system development. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 452, n. 5, p. 573–588, 2006.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 194–204, 2011.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (CEUA/UFSM)



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da curcumina sobre a diferenciação neural (in vitro) de embriões oriundos de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*", protocolada sob o CEUA nº 5191130919 (ID 002815), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva e equipe; Bianca Fagan Bissacotti; Nathieli Bianchin Bottari; Vera Maria Melchior Morsch; Daniel Roulim Stainki; Silvia Gonzalez Monteiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 03/12/2019.

We certify that the proposal "Effects of curcumin on neural differentiation (in vitro) of embryos from *Toxoplasma gondii* infected mice", utilizing 45 Heterogenics mice (15 males and 30 females), protocol number CEUA 5191130919 (ID 002815), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva and team; Bianca Fagan Bissacotti; Nathieli Bianchin Bottari; Vera Maria Melchior Morsch; Daniel Roulim Stainki; Silvia Gonzalez Monteiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 12/03/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2020** a **07/2021**

Área: **Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **45 a 60 dias**

N: **30**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **45 a 60 dias**

N: **15**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: Os animais serão mantidos no biotério de isolamento do laboratório de parasitologia veterinária, do prédio 20, em um ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. A comida e a água serão fornecidas ad libitum. Antes do início do experimento, os animais passarão por um período de adaptação de 10 dias e serão distribuídos em um número de 5 animais por caixa. O fundo da caixa será preenchido com maravalha, que após o uso, será descartada como contaminante e todas as caixas receberão objetos (rolos de papel e/ou PVC) para enriquecimento ambiental. A manipulação dos animais será realizada apenas pelos colaboradores do projeto, considerando os cuidados de manejo de animais, não havendo risco de infecção.

Santa Maria, 17 de maio de 2020

Patricia Severo do Nascimento

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho

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