Elizama Carneiro Machado Bezerra

Avaliação comportamental de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados
com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Regina Meireles
Jaguaribe Ekman

São Paulo

2017

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Elizama Carneiro Machado

Avaliação comportamental de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* / Elizama Carneiro Machado Bezerra. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Descritores: 1. TOXOPLASMA GONDII. 2. TOXOPLASMOSE. 3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL ANIMAL. 4. CAMUNDONGOS. 5. COMPORTAMENTO ANIMAL.

USP/IMTSP/BIB-21/2017.

Dedico esse trabalho

Aos meus pais Irineu Machado Bezerra e Maria Lucia Carneiro Machado Bezerra que por mais de vinte e sete anos de suas vidas terem se depreendido de todo amor, ética, respeito, educação, esforço, compreensão e companheirismo para minha formação, amo vocês.

As minhas irmãs Léa Carneiro Machado Bezerra e Raquel Carneiro Machado Higa, meu cunhado Silas Satoshi Higa e minha sobrinha Agnes por estarem ao meu lado sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Luciana Regina Meireles por todo apoio e dedicação empregados para o desenvolvimento do presente trabalho. Além disso, fico muito feliz pela relação de companheirismo e amizade desenvolvida durante este tempo. Certamente irei levar seu aprendizado e amizade para a vida.

Sou imensamente grata ao Professor Sérgio Vieira dos Santos e ao Professor Dr. Pedro Paulo Chieffi por abrirem as portas de seu laboratório na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, para a realização de testes e manutenção de animais. Agradeço pela atenção, dedicação, energia e ensinamentos que vocês e sua equipe dispensaram de forma extremamente generosa para meu desenvolvimento.

Não posso deixar de agradecer ao Professor Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. pelo auxílio prestado durante o trabalho, além de ajudar na minha manutenção no laboratório. Sua generosidade nas atividades realizadas paralelamente sob vossa supervisão foi muito significativa para mim, irei levar para vida seu exemplo de dedicação e incentivo à Ciência.

À secretária da pós-graduação Eliane Araújo pela atenção durante esse período.

Ao Dr. Fernando, médico veterinário que cedeu gentilmente amostras de urina de gato deixo meu agradecimento.

Agradeço de forma especial e carinhosa a Talita Caroline Coelho, Cynara Marques, Michel Rodrigues e Marina Cunha por acompanharem a minha jornada e por me ajudarem sempre que precisei.

Aos demais colegas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Andrés Gimenez, Luciano Monteiro, Cayuan Brandão, Renan Tripode, Gisele Sartori, Andrea Costa, Camila Carvalho, Barbara Fialho, Jaqueline Polizeli, Thiago Fidelis, Nahiara Zorgi, Francieli Marinho) e do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (Daniel Maurício dos Santos e Érico Silva Tiago), deixo meus sinceros agradecimentos por toda a cooperação, direta ou indiretamente prestadas durante a realização da presente pesquisa. O convívio com essas pessoas tão especiais com certeza proporcionou grande aprendizado e amadurecimento pessoal.

Não posso deixar de agradecer aos amigos e colegas que acompanharam essa trajetória e que auxiliaram durante esse percurso com incentivo, ajuda e companheirismo em períodos alegres e difíceis como Anderson Silva, Naomi Antunes, Luis Gustavo Ribeiro, Fábio Duran, Paula Squarzoni, Luciana Santos, Kedlen Villela, Márcia Morimoto, Samuel Andrade, Letícia Torralbo, Jullie Hernandez, Tâmara Nunes, Tássia Nunes e Profº Dr. Geraldo Busatto Filho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus por mais essa etapa concluída e a minha família por acreditarem e lutarem por meus sonhos sempre. Amo vocês.

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim
devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos;
lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”*

Paulo Beleki

RESUMO

Bezerra ECM. Alterações comportamentais em camundongos BALB/C (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

A manipulação comportamental é uma das principais correntes teóricas utilizadas para explicar as alterações comportamentais presentes em roedores parasitados pelo *Toxoplasma gondii*. Vários estudos propõem que o parasitismo pelo protozoário provoca mudanças metabólicas, imunológicas e neuropatológicas que possibilitam o desenvolvimento de mudanças no comportamento dos indivíduos infectados. Contudo, alguns fatores relacionados ao desenvolvimento da manipulação comportamental, ainda, não estão bem elucidados, entre eles, destaca-se o possível efeito do genótipo da cepa infectante nas modificações comportamentais. Neste trabalho, avaliamos o efeito da infecção crônica por cepas cistogênicas geneticamente distintas de *T. gondii* no comportamento de camundongos. Foram desenvolvidos modelos de infecção experimental com as cepas ME-49 (tipo II) e VEG (tipo III) em camundongos isogênicos BALB/c para avaliação da resposta imune humoral por ELISA, quantificação de parasitas em cistos cerebrais por PCR em tempo real e testes comportamentais como Esquiva Inibitória, Labirinto de Barnes, Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto e Labirinto em Y visando, respectivamente, a avaliação da aprendizagem - memória, ansiedade, atividade locomotora e aversão ao odor do felino. Nossos dados mostram que camundongos infectados pela cepa VEG apresentaram redução mais acentuada da capacidade de recuperação de memória de longo prazo e alterações motoras mais proeminentes do que os animais infectados pela cepa ME-49. Na avaliação da aversão ao odor do felino, verificamos que a infecção pela cepa VEG

induziu uma alteração comportamental mais acentuada no hospedeiro, nas fases iniciais da infecção, do que a infecção pela cepa ME-49, sendo este efeito observado tanto na presença de urina pura de gato como do aminoácido L-felinina. Nossos resultados sugerem que o genótipo da cepa infectante pode influenciar o desenvolvimento de alterações comportamentais em animais infectados pelo *T. gondii*, tornando o hospedeiro mais suscetível e exposto ao predador, sobretudo em infecções causadas por cepas do tipo III.

Descritores: *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmose. Infecção experimental animal. Camundongos. Comportamento animal.

ABSTRACT

Bezerra ECM. Behavioral assessment of BALB/c (*Mus musculus*) mice infected with genetically distinct *Toxoplasma gondii* strains (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

The behavioral manipulation is the main theoretical current used to explain the behavioral changes present in rodents parasitized by *Toxoplasma gondii*. Several studies suggest that protozoan parasitism causes metabolic, immunological and neuropathological changes that allow the development of changes in the behavior of infected individuals. However, some factors related to the development of behavioral manipulation are still not well understood, among them, the possible effect of the genotype of the infecting strain on behavioral modifications is highlighted. In this study, we evaluated the effect of chronic infection by genetically distinct cystogenic strains of *T. gondii* on the behavior of mice. Experimental models were developed with the ME-49 (type II) and VEG (type III) strains in isogenic BALB / c mice to evaluate the humoral immune response by ELISA, quantification of parasites in brain cysts by real-time PCR and behavioral tests as Passive Avoidance, Barnes Maze, Elevated Plus Maze, Open Field and Y - Maze aiming, respectively, evaluation of learning - memory, anxiety, locomotor activity and aversion to feline odor. Our data showed that mice infected with the VEG strain showed a more pronounced reduction in long-term memory retrieval capacity and more prominent motor alterations than the animals infected with the ME-49 strain. In the evaluation of feline odor aversion, we observed that infection by the VEG strain induced a more marked behavioral change in the host in the early stages of infection than the infection by the ME-49 strain, and this effect was observed both in the presence of urine pure cat as the amino acid L-felinine. Our results suggest that the genotype of the infecting strain may influence the development of behavioral changes in *T.*

gondii infected animals, making the host more susceptible and exposed to the predator, especially in infections caused by type III strains.

Descriptors: *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmosis. Experimental animal infection. Mice. Animal behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Oocisto de <i>T. gondii</i>	22
Figura 2-	(A) Taquizoíto da cepa VEG de <i>T. gondii</i> observado no exudato peritoneal de rato. (B) Esquema de um taquizoíto	23
Figura 3-	(A) Cisto cerebral de rato infectado com a cepa VEG de <i>T. gondii</i> . (B) Esquema de um cisto	24
Figura 4-	Ciclo de vida e formas de transmissão de <i>T. gondii</i>	25
Figura 5-	(A-D) Processo de marcação dos animais com Ácido Pítrico para identificação	52
Figura 6-	Período de ambientação dos animais antes da realização dos testes comportamentais (ante-sala)	53
Figura 7-	Esquiva Inibitória	54
Figura 8-	Labirinto de Barnes	55
Figura 9-	Labirinto em Cruz Elevado	58
Figura 10-	Actômetro	59
Figura 11-	Labirinto em Y	60
Figura 12-	Resultados para detecção de anticorpos IgG contra <i>T. gondii</i>	67
Figura 13-	Resultados para detecção de anticorpos contra peptídeos sintéticos cepa-específicos	68
Figura 14-	Quantificação do número de parasitas cerebrais de <i>T. gondii</i> por PCR em Tempo Real	69

Figura 15-	Peso dos animais ao longo do período experimental (gramas)	70
Figura 16-	Peso dos animais ao longo do período experimental (gramas) por grupo	71
Figura 17-	Resultados do teste de Esquiva Inibitória, referente à latência que os animais apresentaram para entrar no compartimento escuro	73
Figura 18-	Número de entradas por grupo experimental nos Testes de Esquiva Inibitória	74
Figura 19-	Gráficos de proporção de entradas no compartimento escuro em relação à latência	75
Figura 20-	Gráficos de proporção de animais em relação às latências e erros obtidos no treinamento do Teste de Barnes	76
Figura 21-	Gráficos de proporção de animais em relação às latências (achar e entrar na toca) apresentados nos testes 1 e 2 no Teste de Barnes	77
Figura 22-	Gráficos de proporção de animais em relação aos erros (antes e depois de achar a toca) apresentados nos testes 1 e 2 no Teste de Barnes	78
Figura 23-	Tempo de ocupação por área (aberta, fechada e central) em segundos no Labirinto em Cruz Elevado	79
Figura 24-	Porcentagem de tempo gasto em cada área do Labirinto em Cruz Elevado em relação ao período total do teste	80
Figura 25-	Número de entradas por área no Labirinto em Cruz Elevado	81
Figura 26-	Porcentagem do número de entradas por braço do aparato Teste de Labirinto em Cruz Elevado em relação a movimentação total dos grupos	82
Figura 27-	Número de entradas nas extremidades dos braços do Labirinto em Cruz Elevado dos diferentes grupos nos testes 1 e 2	83

Figura 28-	Gráfico do número de <i>Head-dipping</i> dos animais no teste de Labirinto em Cruz Elevado	84
Figura 29-	Tempo de imobilidade dos grupos experimentais no teste de Campo Aberto	85
Figura 30-	Movimentos Horizontais e Movimentos Verticais obtidos no teste de Campo Aberto	85
Figura 31-	Movimentos Horizontais e Verticais, avaliação minuto-a-minuto no teste de Campo Aberto	86
Figura 32-	Tempo de <i>grooming</i> e quantidade de pellets fecais no teste de Campo Aberto	88
Figura 33-	Porcentagem de tempo de permanência nas diferentes regiões do aparato no Labirinto em Y	89
Figura 34-	Número de entrada em cada braço do Labirinto em Y contendo urina de gato e L-felinina	90
Figura 35-	Latência de entrada no primeiro braço escolhido no Labirinto em Y	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
AIDs	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BLA	Amígdala Basolateral
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CDC	Centers for Disease Control and Prevention - Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cm	Centímetros
CT	<i>threshold cycle</i> – ciclo limiar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – Ensaio Imunoenzimático
g	Gramas
GR	Glutathione redutase
HCl	Ácido clorídrico
IFN- γ	Intérferon gama
IgG	Imunoglobulina G
m	Metro

M	Molar
mA	Mili-Ampère
MAT	Aglutinação Modificada
min	Minuto
mL	Mililitro
MEApd	Amígdala Medial Posterior
MUP	Molécula estimulante do medo
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
OLM	<i>Oriens Lacunosum Moleculare</i>
OPD	O-phenylenidiamine
PBS	Solução de tampão de fosfato
PBST	PBS-Tween-20
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
s	Segundo
SNC	Sistema Nervoso Central

T. gondii *Toxoplasma gondii*

Th1 T helper 1

TBARs Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

UIPA União Internacional Protetora dos Animais

VMHdm Hipotálamo Ventromedial parte Dorsomedial

μL Microlitro

μg Micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
%	Porcentagem
®	Registrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1	Características do agente: Toxoplas	
1.1.1	Estrutura do agente	21
1.1.2	Formas evolutivas.....	21
1.1.3	Ciclo de vida e formas de transmissão.....	24
1.1.4	Diversidade genética e virulência de <i>T. gondii</i>	26
1.2	Toxoplasmose.....	30
1.3	<i>Toxoplasma gondii</i> e comportamento	33
1.3.1	Manipulação comportamental.....	33
1.3.2	Estudos Comportamentais em animais infectados com <i>Toxoplasma gondii</i>	35
1.3.3	Alterações Neurofisiológicas da infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	38
1.3.4	Toxoplasmose e aspectos comportamentais e neurofisiológicos: comparação entre diferentes cepas.....	42
2	OBJETIVOS.....	46
2.1	Geral.....	46
2.2	Específicos	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	Animais.....	49
3.2	Parasitas	50
3.3	Preparação e quantificação de inóculos	50
3.4	Delineamento experimental	51
3.5	Testes comportamentais	51
3.5.1	Teste de Esquiva Inibitória	53
3.5.2	Teste Labirinto de Barnes.....	55
3.5.3	Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	57
3.5.4	Teste de Campo Aberto	58
3.5.5	Teste de Labirinto em Y	59

3.6	Avaliação da resposta imune humoral	61
3.7	Avaliação da resposta imune humoral cepa - específica	61
3.7.1	Peptídeos sintéticos cepa - específicos	61
3.7.2	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay</i> (ELISA) com peptídeos sintéticos cepa - específicos	62
3.8	Quantificação de parasitas cerebrais	63
3.8.1	Extração e purificação do DNA para PCR em tempo real.....	63
3.8.2	Quantificação de parasitas cerebrais de camundongos BALB/c por PCR em tempo real	63
3.8.3	Determinação do limite de detecção.....	64
3.9	Análise Estatística	65
4	RESULTADOS	67
4.1	Avaliação da resposta imune humoral por ELISA.....	67
4.1.1	Detecção de anticorpos totais.....	67
4.1.2	Detecção de anticorpos cepa-específicos.....	68
4.2	Quantificação de parasitas cerebrais por PCR em tempo real	69
4.3	Pesagem dos Animais	70
4.4	Testes Comportamentais	72
4.4.1	Teste de Esquiva Inibitória	72
4.4.2	Teste de Labirinto de Barnes	75
4.4.3	Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	78
4.4.4	Teste de Campo Aberto	84
4.4.5	Teste de Labirinto em Y	88
5	DISCUSSÃO.....	93
6	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS	112

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Características do agente: *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo *Apicomplexa*, subclasse *Coccidia*¹. A descrição do *Toxoplasma gondii* ocorreu simultaneamente em 1908, com os estudos realizados por Splendore em coelhos no Brasil e por Nicolle e Manceaux em uma espécie de roedor norte africano. Em 1937, os aspectos clínicos da toxoplasmose congênita foram abordados por Wolf e Cowen. Somente em 1965, a importância do felino no ciclo biológico do parasita foi reconhecida de forma independente por alguns pesquisadores. Em 1970 observou-se que a fase sexual do ciclo biológico do protozoário ocorria no intestino delgado dos felinos e que estes eliminavam os oocistos pelas fezes².

1.1.1 Estrutura do agente

O filo ao qual *T. gondii* pertence (*Apicomplexa*), possui algumas características importantes, como a presença do complexo apical, formado por organelas específicas, como: roptrias, micronemas, conóide e anéis polares. Considera-se que tais componentes tenham um importante papel no processo de adesão do parasita a superfície da célula hospedeira e invasão da mesma. A função e interação desses componentes ainda não são completamente conhecidas^{3,4}.

1.1.2 Formas evolutivas

T. gondii possui três formas evolutivas que serão descritas a seguir:

Oocistos: o oocisto é formado por dois esporocistos cada um incluindo quatro esporozoítos que são formas infectantes excretadas apenas nas fezes de felinos parasitados em uma fase inicial da primo infecção (Fig. 1). Sua formação ocorre pela reprodução sexuada do parasita nas células intestinais dos felinos¹.

Figura 1 – Oocisto de *T. gondii*⁴.

Taquizoítos: Com a ingestão de oocistos (esporozoítos) ou cistos teciduais (bradizoítos), estes se transformarão em taquizoítos no interior do hospedeiro (Fig. 2). Uma das características mais marcantes desta forma evolutiva é sua rápida multiplicação^{1, 4}. Após a invasão da célula hospedeira pelo parasita, forma-se o vacúolo parasitóforo que consiste em uma estrutura de interligação e comunicação entre o parasita e o citoplasma da célula parasitada. Acredita-se que o vacúolo seja originado durante o processo de invasão da célula hospedeira, pois tem se observado nessa estrutura compostos da membrana celular, além de lipídeos secretados pelo protozoário⁵.

A multiplicação exacerbada dos taquizoítos no interior da célula hospedeira pode culminar no rompimento da mesma, causando a liberação dos parasitas presentes em seu interior, tornando-os disponíveis para invadir as células vizinhas.

Nessa fase ocorre a resposta mais proeminente do sistema imune (caracterizando a fase aguda da infecção), podendo se observar manifestações clínicas em alguns casos¹.

Figura 2 – (A) Taquizoíto da cepa VEG de *T. gondii* observado no exudato peritoneal de rato. É possível observar algumas estruturas como: No – Nucléolo; Nu - Núcleo; Pv – Vacúolo Parasitóforo; Rh – Roptrias; Go – Complexo de Golgi; Dg – Granulos Densos⁶. (B) Esquema de um Taquizoíto⁴.

Bradizoítos: são caracterizados pela menor taxa de multiplicação e por formarem cistos no tecido nervoso e muscular (Fig. 3). Acredita-se que a transformação dos taquizoítos em bradizoítos seja decorrente da ação da resposta imune do hospedeiro durante o combate ao protozoário, uma vez que essa forma é mais resistente a ação enzimática, além de apresentar pequenas diferenças na expressão gênica em comparação com os taquizoítos^{1, 4}.

Figura 3 - (A) Cisto cerebral de rato infectado com a cepa VEG de *T. gondii*⁶. (B) Esquema de um cisto⁴.

1.1.3 Ciclo de vida e formas de transmissão

O hospedeiro definitivo (felino) quando parasitado libera oocistos imaturos nas fezes (Fig. 4). Estes oocistos esporulados no ambiente podem ser ingeridos através do consumo de água e alimento contaminados. *T. gondii* tem a capacidade de infectar mais de uma espécie de hospedeiros, sendo os felinos os únicos hospedeiros definitivos e os demais animais de sangue quente os hospedeiros intermediários^{1,4,7,8}.

Figura 4 - Ciclo de vida e formas de transmissão de *Toxoplasma gondii*⁹.

Em relação aos felinos, uma das principais formas de infecção com o parasita ocorre através do consumo de carne contendo cistos teciduais de suas presas^{10,11}. De acordo com a ABINPET¹² (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação) a estimativa populacional dos gatos no Brasil é de 21,3 milhões com tendência de crescimento. A soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* na população felina é variada. Um estudo realizado com amostras de soro provenientes de 100 gatos abrigados na UIPA (União Internacional Protetora dos Animais) em São Paulo/SP obteve uma soroprevalência pelo método de ELISA de 40%¹³. Pena *et al.*¹⁴ obtiveram um índice de 35,4%, utilizando o método de Aglutinação Modificada (MAT), em uma amostra de 237 gatos obtidos em diversos CCZs (Centros de Controle de Zoonoses) de diferentes municípios de São Paulo. Entretanto, outra avaliação recente, realizada com amostras de soros de 386 gatos

mantidos no CCZ de Araçatuba/SP, utilizando a RIFI (Imunofluorescência indireta), obteve uma soroprevalência de 16,3 %¹⁵. Talvez a discrepância entre os dados seja resultante dos diferentes métodos diagnósticos empregados entre outros fatores, porém, como se pode observar há índices que podem ser considerados elevados (35-40%), demonstrando a importância dos gatos na possibilidade de disseminação e transmissão do parasita.

Além da infecção por oocisto e consumo de carne contendo cistos teciduais, outras formas de transmissão do parasita para o ser humano são a transfusão sanguínea e transplante de órgãos, transferência horizontal da gestante para o feto (toxoplasmose congênita) e transmissão por acidente laboratorial^{4,9}.

1.1.4 Diversidade genética e virulência de *T. gondii*

O trabalho pioneiro de genotipagem de *T.gondii* foi relatado por Howe e Sibley (1995), que propuseram a classificação das cepas em três genótipos clonais (tipo I, II e III) ¹⁶, demonstrando uma estrutura de população clonal na Europa e na América do Norte¹⁶. Acredita-se que a diferença genética entre os três tipos clonais seja de cerca de 2% na sequência genômica¹⁷. Embora, este modelo, ainda, seja evidenciado em grande parte do hemisfério norte, sabe-se, atualmente, que a estrutura populacional de *T.gondii* não está limitada a três linhagens clonais, mas sim a um modelo mais complexo com pelo menos 15 haplogrupos em todo o mundo¹⁸.

Os dados mais recentes de genotipagem de *T.gondii* foram relatados em um artigo de revisão conduzido por Shwab *et al.*¹⁹, que utilizaram 1457 amostras provenientes de todos os continentes, exceto da Antártica, compondo o quadro mais abrangente e coeso da estrutura populacional global de *T. gondii* já descrito na literatura. Essa extensa coleção de isolados foi analisada por PCR-RFLP com 10

marcadores distintos, revelando a existência de 189 genótipos diferentes de *T.gondii* no mundo. Os dados foram baseados nos resultados publicados até o final de 2012 e a grande maioria dos isolados foi obtida de animais domésticos e selvagens com infecção crônica, sendo que para estas amostras, a infecção por *T. gondii* foi determinada pela presença de anticorpos anti-*Toxoplasma* no soro, seguida de bioensaio de tecidos animais soropositivos (cérebro e / ou músculo) em camundongos ou gatos. Na ausência de uma nomenclatura padrão para os diferentes genótipos de *T.gondii*, dado que a designação convencional define apenas as linhagens clonais como Tipo I, II e III e agrupa todas as demais como genótipos “atípicos” ou “exóticos”^{16, 18, 20}, os autores propuseram um esquema de nomenclatura em que cada isolado foi designado pelo genótipo obtido por PCR-RFLP da base de dados ToxoDB, seguido por um número diferencial específico.

A partir dos dados desta revisão é possível identificar que apenas alguns genótipos dominam no hemisfério norte, o que contrasta profundamente com o hemisfério sul, onde centenas de genótipos coexistem e nenhum deles é dominante, sugerindo uma estrutura de população clonal no norte e uma estrutura de população epidêmica no sul. Esses achados corroboram fortemente com a conclusão de um estudo realizado com uma amostragem menor de isolados²¹. Os genótipos de PCR-RFLP # 1 (Clonal de Tipo II), # 2 (Tipo III), # 3 (Variante de Tipo II) e # 10 (Tipo I) são identificados globalmente. Os genótipos # 2 e # 3 dominam na África, os genótipos # 9 (chinês 1) e # 10 são prevalentes na Ásia, os genótipos # 1, # 2 e # 3 são prevalentes na Europa, os genótipos # 1, # 2, # 3, 4 e # 5 dominam na América do Norte (# 4 e # 5 são conhecidos coletivamente como Tipo 12). Na América Central e do Sul, não há dominância clara de qualquer genótipo, embora alguns tenham freqüências relativamente mais altas. De acordo com a análise estatística realizada por Shwab *et al.*¹⁹ há diferenças significativas entre as populações da África, Ásia, Europa, América do Norte e América Central e do Sul,

com apenas a Europa e América do Norte exibindo similar diversidade. Coletivamente, os resultados revelam estruturas populacionais distintas e padrões geográficos de diversidade de *T. gondii*¹⁹.

Os 10 genótipos mais frequentemente identificados mundialmente são os genótipos # 2, # 3, # 1, # 5, # 4, # 9, # 6, # 7, # 8 e # 10, representando 13,8, 12,6, 12,2, 5,0, 4,5 3,8, 3,3, 2,6, 2,3 e 2,1% das amostras, respectivamente. Os genótipos # 1 e # 3, que diferem apenas no *locus* Apico, compõem a linhagem convencional Tipo II e representam 24,6% (362/1457) da população. O genótipo # 1 é referido como de Tipo II clonal, enquanto que o # 3 como Tipo II variante. Conforme observado, o genótipo # 2, também conhecido como Tipo III, respondeu por 13,8% (201/1457) das amostras. Os genótipos # 4 e # 5, que diferem apenas no *locus* SAG1 são coletivamente conhecidos como Tipo 12, representaram 9,5% (139/1457) da população. Os resultados mostraram que os genótipos # 1, # 2 e # 3 (Tipo II clonal, Tipo III e Tipo II variante) são identificados em todo o mundo. Estes três genótipos são altamente prevalentes na Europa. Os genótipos # 1, # 2, # 3, # 4 e # 5 dominam na América do Norte. Os genótipos # 2 e # 3 (dos Tipos III e II variante) dominam na África, e os genótipos # 9 e # 10 (Chinês 1 e Tipo I) são prevalentes no Leste Asiático¹⁹.

A distribuição dos genótipos de *T. gondii* diverge nas diferentes áreas geográficas. Na América do Norte, há um predomínio de cepas tidas como do tipo II, seguido por cepas do Tipo III e um genótipo 12 tido como a quarta linhagem clonal americana, muito comum em animais selvagens e as cepas do tipo I são raras. Na Europa, assim como na América do Norte, há um predomínio das três linhagens clonais, principalmente de genótipos tidos como tipo II. Na Ásia, há predomínio de um genótipo recombinante típico dessa região e um genótipo do tipo I e na África ocorrem mais genótipos do tipo II, III e um genótipo recombinante africano. Por fim, na América Central e do Sul há uma ampla diversidade genética

de *T. gondii*, sem predomínio de nenhum tipo de cepa específica. Acredita-se, também, que o ciclo selvagem tenha grande importância para a observação de uma variabilidade genética maior, no qual se observa polimorfismos únicos e diferentes linhagens clonais^{19, 21}.

Pesquisadores acreditam que o *T. gondii* tenha surgido nas Américas Central e do Sul, devido a sua alta diversidade gênica nessas regiões e que alguns genótipos tenham se disseminado para as outras regiões do globo se tornando dominantes¹⁹. Outra questão importante, é que o desenvolvimento da agricultura em diversas regiões, principalmente na América do Norte, Europa e Ásia, pode ter provocado à redução da população de animais selvagens nessas áreas e, conseqüentemente, a diminuição da diversidade genética do parasita no ambiente selvagem¹⁹.

Em relação à virulência de *T.gondii*, o genótipo da cepa infectante é um fator importante, já que, em modelo murino, está associado à gravidade da doença²². As cepas do tipo I são altamente virulentas em camundongos e a infecção pode levar à morte do animal com baixa dose de inóculo (LD 100 =1), já as cepas do tipo II e III apresentam baixa virulência nesses animais, possibilitando maior sobrevivência dos mesmos e formação de cistos teciduais (LD50>10³)²². A virulência de uma cepa está relacionada, dentre outros aspectos, a sua capacidade de atravessar barreiras epiteliais, atingir a corrente sanguínea e se disseminar no organismo, além do tempo gasto para sua multiplicação. Contudo, a virulência não depende apenas das propriedades das cepas, mas também das características dos hospedeiros que podem ser mais ou menos susceptíveis à infecção^{4, 17, 23}.

Outros fatores que podem influenciar a virulência de *T.gondii*, principalmente em modelo experimental, são: (i) via de infecção, já que pesquisas vêm demonstrando maior patogenicidade e virulência para infecções realizadas por via intraperitoneal²⁴; (ii) forma infectante do parasita, pois o oocisto tem se mostrado

mais infeccioso para camundongos do que as demais formas do agente^{24, 25}; (iii) espécie animal utilizada em laboratório, pois já foi demonstrado que as diferentes linhagens de roedores podem apresentar resistência ou suscetibilidade de forma diferenciada frente às diversas cepas de *T. gondii*. Neste sentido, os genes do complexo MHC de classe I (haplótipo H-2) estão associados à resistência do animal à infecção²⁶, demonstrando que o fundo genético do hospedeiro é importante em relação à patogenicidade do agente²⁴.

Em relação à virulência das cepas recombinantes, ainda, não foram realizados ensaios experimentais suficientes para definir o padrão das mesmas em modelo experimental, porém, devido à recombinação genética é esperada uma variação na virulência destas cepas¹⁷. Observações empíricas de casos em humanos têm revelado que as cepas sul americanas circulantes são mais patogênicas do que as cepas circulantes em outros lugares no mundo, o que explicaria os casos fatais de toxoplasmose disseminada em regiões tropicais da América do Sul como no Suriname²⁷.

1.2 Toxoplasmose

De acordo com o Remington *et al.*²⁸, a maioria dos indivíduos imunocompetentes que são infectados pelo parasita não desenvolvem a doença e a infecção permanece assintomática. Um dos fatores que podem influenciar a ocorrência dessa condição, na maioria dos casos, é a resposta imune do indivíduo. Como se trata de um parasita intracelular, a resposta imune celular é muito mais efetiva para a destruição do parasita, sendo a resposta do tipo Th1 muito importante, com liberação de IFN- γ e outras citocinas que são responsáveis pela ativação de macrófagos e destruição de células infectadas²⁹. Contudo, devido à gravidade apresentada em casos de pacientes imunodeficientes, principalmente

com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), e em casos de toxoplasmose congênita, o desenvolvimento da infecção pode ser mais severo, dando relevância à toxoplasmose como problema de saúde pública.

A prevalência da toxoplasmose é variável, mas acredita-se que um terço da população mundial tenha tido contato com o parasita³⁰. As taxas mais elevadas de prevalência são observadas em ambientes quentes e úmidos³⁰ e, além disso, também têm se observado um aumento da prevalência com o avanço da idade³⁰. A toxoplasmose está relacionada a questões de qualidade dos recursos hídricos e de hábitos de higiene da população. Não se sabe ao certo a importância da presença do gato no ambiente domiciliar como fator de risco para a toxoplasmose humana³¹.

Atualmente, existe uma vacina para a toxoplasmose (Toxovax®) que é utilizada em alguns animais de produção, principalmente ovelhas, porém esta não se mostra eficaz para aplicação em humanos³². Assim, a melhor forma de prevenção da toxoplasmose é a educação sanitária, na qual a disseminação de informações, como evitar o consumo de alimentos mal cozidos, realizar a higiene adequada de alimentos crus, ingerir água filtrada, além de questões de higiene pessoal, consiste no principal recurso para o combate à doença³¹.

Apesar da maioria dos casos serem assintomáticos, a toxoplasmose pode apresentar algumas formas clínicas importantes, incluindo manifestações decorrentes da doença ocular, congênita, ou advinda da imunossupressão²⁸.

Na toxoplasmose ocular a manifestação clínica pode ser observada na fase aguda da infecção, ou em casos de reativação da doença, tanto em indivíduos com toxoplasmose congênita ou adquirida no período pós-natal. A toxoplasmose ocular é caracterizada por um quadro de retinocoroidite, incluindo lesões na retina e processo inflamatório intenso¹. Alguns trabalhos têm demonstrado que a toxoplasmose ocular é a principal causa de uveíte no mundo, sendo que as manifestações clínicas, geralmente, ocorrem na segunda e quarta décadas de vida

do indivíduo acometido³³. Essa faixa etária é a mais produtiva para o indivíduo, portanto, a toxoplasmose ocular pode gerar prejuízos econômicos, pois em alguns casos pode acarretar em perda visual.

As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita não são exclusivas da infecção pelo *T. gondii* podendo ser observadas em outros quadros infecciosos provocados por citomegalovírus, herpes, rubéola e sífilis. Entre as manifestações mais frequentes estão a hidrocefalia, microcefalia, alterações no desenvolvimento motor e intelectual, calcificações cerebrais, nefrose congênita, retinocoroidite e perda auditiva. *T. gondii* infecta o feto via transplacentária, sendo que os efeitos da infecção são mais significativos no primeiro trimestre de gestação, acarretando aborto espontâneo, morte fetal e sequelas neurológicas graves. Acredita-se que a gravidade das sequelas da toxoplasmose congênita diminui com o avanço do período gestacional de infecção, porém sem tratamento adequado o prognóstico pode piorar. Atualmente, não foi relatada transmissão do *T.gondii* através da amamentação, portanto, mães infectadas podem amamentar seus filhos^{1, 34, 35}.

Em indivíduos imunocomprometidos, a toxoplasmose, geralmente, é resultante de uma reativação da infecção crônica, ocasionando comprometimento acentuado do Sistema Nervoso Central (SNC), com alterações do estado mental, convulsões, distúrbios na movimentação entre outros sintomas¹. A toxoplasmose é uma das principais doenças oportunistas em imunocomprometidos e uma importante causa de morte em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A toxoplasmose é a causa mais comum de lesões cerebrais focais em pacientes com AIDS e se desenvolve em aproximadamente um terço daqueles que são soropositivos para *T.gondii*³⁶. Um levantamento realizado em São Paulo sobre as principais causas de óbito em pacientes HIV positivos demonstrou que a toxoplasmose foi responsável por 12,2% das mortes³⁷.

1.3 *Toxoplasma gondii* e comportamento

1.3.1 Manipulação comportamental

O parasita é aquele que tem a capacidade de explorar seu hospedeiro de forma a obter benefícios, tais como abrigo, alimentação, transporte e reprodução³⁸. Uma das formas de atuação parasitária, embora não seja exclusiva desses organismos, é através da manipulação comportamental. A hipótese de manipulação comportamental pressupõe a necessidade de mecanismos adaptativos da relação parasita e hospedeiro para o desenvolvimento de comportamentos alterados, como forma de melhorar a transmissão do parasito^{38, 39, 40}. A seleção natural de adaptações seria o mecanismo pelo qual, a manipulação comportamental poderia modificar o comportamento do hospedeiro⁴¹.

No entanto, em relação ao *T. gondii*, alguns pesquisadores questionam se as mudanças no comportamento do hospedeiro não são fruto da presença do parasita e dos mecanismos de combate ao mesmo, sem ter relação a uma adaptação do parasita ao hospedeiro, podendo ser subprodutos inespecíficos do combate à infecção^{42, 43}. Outra questão relevante em relação ao comportamento de animais com patologias é o comportamento doentio. Acredita-se que durante processos patológicos o comportamento de alguns animais pode ser alterado, sendo comum o aumento da letargia, diminuição da atividade locomotora e consumo de água e alimento. Esses e outros fatores podem contribuir para a diminuição do gasto energético e exposição do animal a riscos em um período de maior vulnerabilidade⁴⁴. Desta forma, não se pode descartar que a infecção experimental pelo parasita não possa ser influenciada por esta questão, uma vez que Mahmoud e colaboradores⁴⁵ observaram a influência de comportamento

doentio em animais infectados⁴⁵. Todavia são poucos os artigos que tratam do tema e maiores investigações são necessárias³⁸.

Alguns estudos destacam que a alteração comportamental causada pelo *T. gondii* tenha como objetivo a transferência do parasita do hospedeiro intermediário para o definitivo, permitindo a conclusão do ciclo biológico do mesmo, uma vez que a fase sexuada ocorre apenas nos felinos¹⁰, beneficiando a transmissão das informações genéticas do parasita para as futuras gerações, garantindo assim, a variabilidade genética dentro da população⁴⁶. Assim, o mecanismo para conseguir atingir seu alvo (felino) ocorreria através do controle comportamental do hospedeiro intermediário, de maneira que, este se torne mais susceptível à predação, dado que os felinos em sua totalidade são carnívoros, portanto, beneficiando-se do consumo de animais infectados pelo protozoário^{10, 11, 47}.

Vários estudos vêm demonstrando que o *T. gondii* não seria o único protozoário capaz de alterar o comportamento em roedores³⁹. Um trabalho realizado com diferentes espécies de *Plasmodium* (parasita responsável pela malária), demonstrou que camundongos *Mus musculus* infectados apresentaram redução da atividade locomotora que coincidiu com o período de maior infecciosidade para o vetor, mostrando que possivelmente as mudanças comportamentais, nesse caso, podem representar maior sucesso de transmissão do parasita para seu vetor⁴⁸. Outro estudo recente levanta a hipótese de que camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi* apresentam diferenças na liberação de compostos voláteis (odor) em comparação com animais não infectados, o que coincidiu com uma preferência dos vetores para esses animais⁴⁹. Interessante observar que o *Plasmodium* talvez possa alterar o comportamento tanto no hospedeiro (roedor) como no vetor, mostrando que protozoários possam ter desenvolvido mecanismos eficazes de manipulação comportamental, visando maior sucesso de transmissão aos seus hospedeiros.

1.3.2 Estudos Comportamentais em animais infectados com *Toxoplasma gondii*

O desenvolvimento das pesquisas que avaliaram as alterações comportamentais em animais infectados pelo *T. gondii* demonstraram que a infecção pode ocasionar alterações em uma série de habilidades e capacidades, dentre estes destacamos a alteração locomotora, ansiedade, aprendizagem, memória e principalmente o desenvolvimento de uma atração ao odor do predador (felino).

Em relação à locomoção há várias formas de avaliação desse mecanismo, incluindo o teste de campo aberto⁴³, porém avaliações em animais infectados com *T. gondii* mostram resultados conflitantes. Há pesquisas que observaram um aumento no nível de atividade locomotora em animais infectados^{7, 50}, enquanto outros observaram uma diminuição dessa atividade^{46, 51}. Kannan e colaboradores⁵² não observaram interferência da infecção por *T. gondii* na atividade locomotora. Acredita-se que o aumento da locomoção seja um comportamento de risco, pois pode permitir maior percepção pelo predador da presença da presa, sendo considerada uma alteração comportamental que aumenta as chances de predação.

Já em relação à ansiedade, algumas pesquisas utilizando o Labirinto em Cruz Elevado demonstraram que a infecção pelo protozoário tem efeito ansiolítico nos animais^{50, 51}, porém assim como na atividade locomotora, há resultados divergentes, já que alguns autores observaram alterações nesse quesito⁵². A redução da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado é caracterizada pela maior exploração dos braços abertos, que correspondem às áreas mais expostas do labirinto. Assim, acredita-se que os animais que exibem esse comportamento se expõem mais, colaborando com o aumento das chances de predação pelo parasita. Contudo, o Labirinto em Cruz Elevado não é a única forma de avaliação da

ansiedade, pode-se utilizar o Campo Aberto, ao se mensurar o tempo de permanência na área central e laterais da arena como medida de ansiedade⁴³. Desta forma, o teste de Campo Aberto bem como Labirinto em Cruz Elevado seriam testes espelhos, pois com ambos é possível averiguar ansiedade e inferir informações da atividade locomotora, cada um com maior especificidade para um parâmetro. Algumas pesquisas que utilizaram o Campo Aberto para avaliação da ansiedade não observaram diferenças entre animais infectados e seus controles⁵⁰.

51, 53.

A princípio, a aprendizagem e a memória não estão relacionadas à predação, porém um estudo que avaliou o efeito da infecção congênita por *T. gondii* demonstrou que os animais que nasceram com essa condição apresentaram déficit de aprendizagem e redução da aquisição de memória no teste de Esquiva Inibitória. O mais interessante é que esse efeito só foi observado na prole oriunda de infecções em períodos iniciais e intermediários de gestação das fêmeas, coincidindo com o observado em humanos, já que, infecções de gestantes, principalmente no primeiro trimestre de gestação, geram maior risco de alterações ao feto^{1, 34}. Outra avaliação mais específica da memória foi realizada com o teste de Labirinto de Barnes em ratos machos com oito semanas de infecção, mostrando que esses animais tiveram atividade debilitada de aquisição de memória⁵⁴. Embora tais comportamentos não estejam diretamente relacionados à predação, como os anteriores, alterações de aprendizagem e aquisição de memória podem ter importantes implicações, no reconhecimento de estímulos e ambientes aversivos ou que apresentam risco ao hospedeiro.

E por fim, uma das alterações comportamentais mais intrigantes observada em roedores infectados com *T. gondii* é a redução da aversão ao odor do felino. Alterações da locomoção e ansiedade podem acarretar maior risco de predação geral, porém, a redução da aversão ao odor do felino demonstra mudança

comportamental específica da presa (roedor) beneficiando o felino hospedeiro definitivo do *T. gondii*. Vários estudos demonstraram uma redução da aversão da presa ao odor do predador felino^{52, 53, 55}. Estes autores também compararam a aversão do roedor ao odor de outros animais como coelhos e fuinhas que também são seus potenciais predadores, mas a redução da aversão ao odor destes animais foi inferior ao observado para o felino^{53, 56}.

Não se sabe ao certo como a infecção pelo *T. gondii* modifica esse comportamento, porém algumas hipóteses foram formuladas. Uma pesquisa que utilizou ratos machos expostos ao odor de felino e de ratas em fase reprodutiva demonstrou que os animais infectados tiveram uma atração ao odor do felino. Exames de imagem evidenciaram que a atividade cerebral desses animais foi semelhante ao de ratos sem infecção quando expostos ao odor das fêmeas, indicando que o protozoário pode alterar a percepção e processamento do odor⁵⁷.

Ao se investigar o processamento da informação olfativa da presença do predador pelo roedor, um órgão ganha destaque. O órgão vomeronasal está localizado no fundo da cavidade nasal e uma de suas características é apresentar um fundo cego, no qual, as terminações nervosas ficam expostas para captação da informação do odor que é encaminhada para circuitaria cerebral responsável pelo seu processamento. Animais geneticamente modificados que tiveram perda de função desse órgão tiveram uma atração ao odor do predador⁵⁸. Esse achado pode ser uma via de investigação para o *T. gondii*, pois colabora com a importância de maiores estudos sobre as vias nervosas da informação olfativa e como eventualmente a infecção parasitária teria a capacidade de alterá-las.

Flegr *et al.*⁴⁰ observaram que homens soropositivos para *T. gondii* apresentaram preferência olfativa ao odor da urina de gato doméstico em comparação com outros animais, inclusive com a urina de tigre que também é um felino. Desta forma, os pesquisadores avaliaram a diferença entre a urina do gato e

a do tigre e chegaram a um aminoácido L-felinina secretado apenas na urina do gato doméstico, o qual, acredita-se que seja um dos responsáveis pelo odor de demarcação territorial dessa espécie⁵⁹. Assim, os pesquisadores levantaram a hipótese de que tal aminoácido possa estar envolvido na atração ao odor do felino em humanos⁴⁰. Em animais, Papes *et al.*⁵⁸ demonstraram que algumas proteínas secretadas na urina dos predadores funcionam como moléculas estimulantes do medo. Assim, os poucos trabalhos na área levam a crer que o processamento olfativo de certas moléculas encontradas na urina possa ser alterado em decorrência da infecção pelo *T. gondii*. Avaliar essa questão é extremamente relevante para descobrir quais moléculas são importantes na relação presa-predador e como eventualmente o *T. gondii* pode alterar a atividade do SNC e o processamento da informação olfativa dessas moléculas.

Como podemos observar são muitas as questões, ainda, sem resposta para as alterações comportamentais observadas em animais infectados pelo *T. gondii* e os desafios são maiores, já que outros fatores também parecem influenciar as manifestações comportamentais em animais infectados, tais como carga parasitária⁵¹, tempo de infecção^{52, 60}, sexo do hospedeiro⁶¹ e estímulo ambiental⁵⁵.

1.3.3 Alterações Neurofisiológicas da infecção pelo *Toxoplasma gondii*

Em relação aos mecanismos pelo qual o parasita atua no SNC, Parlog *et al.*⁶² descrevem que o *T. gondii* pode apresentar tanto um efeito direto como indireto nas células nervosas. Dentre as alterações que ocorrem diretamente no SNC estão a localização dos cistos cerebrais, alteração da dopamina, silenciamento funcional de neurônios, injeção de proteínas em células não parasitadas e alterações na apoptose. Já em relação aos efeitos indiretos do toxoplasma no SNC destacam-se fatores relacionados a resposta imune⁶².

Estudos iniciais sobre alteração comportamental em animais infectados pelo *T. gondii* acreditavam que a presença e a distribuição dos cistos no SNC dos animais fosse um fator primordial para o desenvolvimento de mudanças comportamentais. Algumas pesquisas observaram uma distribuição dos cistos principalmente em regiões do sistema límbico como amígdala e hipotálamo^{53, 60}. Como a amígdala, é uma região do SNC relacionada ao medo, acreditava-se que alterações nessa área poderiam explicar parte das alterações comportamentais observadas nos animais infectados⁵³. Contudo a observação de um padrão de distribuição aleatório de cistos⁴⁶ e a atração ao odor do felino por animais infectados com cepa do tipo I recombinante não cistogênica foram marcos importantes para o questionamento dessa premissa⁶³.

Em relação à dopamina, sabe-se que o *T. gondii* tem em seu DNA dois genes que codificam uma enzima tirosina hidroxilase homóloga a dos mamíferos³⁸. Essa enzima está relacionada à velocidade de síntese desse neurotransmissor e estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” demonstraram que células neurais infectadas pelo parasita quando estimuladas podem secretar até três vezes mais dopamina do que células não infectadas. Em humanos, o aumento dos níveis de dopamina está relacionado ao desenvolvimento da esquizofrenia⁶⁴.

Atualmente, com o desenvolvimento das pesquisas sobre os efeitos neurofisiológicos da infecção pelo *T. gondii*, novas hipóteses têm surgido, para explicar as alterações comportamentais. Haroon *et al.*⁶⁰ observaram que a infecção pode resultar no silenciamento funcional dos neurônios, uma vez que células infectadas foram hipersensíveis ou não responsivas à estimulação pelo glutamato, ambos os efeitos podem resultar em uma alteração do funcionamento da célula nervosa, causando perda de função. Outro possível mecanismo de atuação do parasita é a injeção de proteínas em células não parasitadas pelo mesmo. Koshy *et al.*⁶⁵ constataram a presença de proteínas da roptria em células neurais que não

foram infectadas pelo *T. gondii*. Os pesquisadores ainda, não sabem ao certo a importância desse evento para a infecção cerebral pelo toxoplasma, porém acredita-se que tal mecanismo seja uma forma de evasão da resposta imune, já que as células não parasitadas, mas com proteínas do parasita em seu interior estariam mais propensas ao ataque da resposta imune, aumentando as chances de preservação das células realmente parasitadas.

Outra maneira de preservação de células infectadas sem a participação da resposta imune seria a alteração da apoptose. Esse fenômeno foi observado por Goebel *et al.*⁶⁶, no qual, células neurais infectadas apresentaram inibição da clivagem das caspases 3 e 9. Já Grauman *et al.*⁶⁷ verificaram alterações na clivagem de subunidades da caspase 8. As caspases são proteínas que estão presentes na via de ativação do processo de apoptose, portanto, alterações nessas estruturas gerariam produtos inadequados para a transmissão da sinalização da morte celular.

Desta forma, os efeitos diretos do parasita nas células nervosas poderiam ser resumidos em meios de evasão da resposta imune e preservação das células infectadas o que poderia levar à manutenção do parasita no SNC pelo resto da vida do hospedeiro. Contudo, o efeito da infecção no funcionamento neural e a alteração na produção de neurotransmissores, a presença dos cistos e a lesão tecidual causada por tais estruturas não podem ser descartadas como fatores responsáveis pelo desenvolvimento de alterações comportamentais. Além disso, no que se refere ao SNC, a complexidade torna-se muito maior, pois, além dos mecanismos citados anteriormente, os pesquisadores observaram que fatores relacionados a resposta imunológica também podem causar alterações neurofisiológicas capazes de acarretar mudanças comportamentais.

Após a instalação do parasita no SNC que pode ocorrer após sete dias de infecção, há a ativação de células da glia, astrócitos e recrutamento de células T

periféricas e células mononucleares⁶². A ativação de células imunológicas leva à síntese de diversas citocinas, que podem alterar a síntese de neurotransmissores. Outra questão importante é que a infecção pelo *T. gondii* aumenta a síntese e liberação de óxido nítrico(NO) que tem efeito citotóxico, auxiliando na destruição das células infectadas, porém, estas não são as únicas funções do NO, já que o mesmo pode ser um neurotransmissor no SNC. Em um organismo sadio os níveis de NO estão em equilíbrio, entretanto quando os níveis estão elevados ele pode ocasionar processos neuro-degenerativos⁶⁸. No que se refere a esta questão, ainda, não foram observados em modelo animal os mecanismos efetivos de atuação do NO.

Flegr⁶⁹ ressalta outro fator a ser considerado, que é a influência da resposta imune do hospedeiro sobre o aparecimento de alterações comportamentais nos indivíduos infectados. Em relação ao tema, Koçak *et al.*⁷⁰ observaram a presença de lesões (maior taxa de glicose, necrose, infiltração celular) no tecido nervoso de animais parasitados. As áreas mais afetadas foram amígdala, tálamo, lobo temporal e parietal. A partir dessa observação, levantou-se a hipótese de que, além da localização e distribuição dos cistos, acredita-se que as lesões nas áreas afetadas também possam ter efeito no comportamento dos animais infectados.

Embora as mudanças causadas por fatores imunes, ainda, não estejam bem elucidadas, já se tem observado alterações da neuroplasticidade em animais infectados. Parlog *et al.*⁶² avaliaram camundongos C57 infectados com a cepa ME49 e constataram simplificação e redução dendrítica em células do córtex e hipocampo. Já, Mitra *et al.*⁷¹ ao avaliarem a infecção pela cepa do tipo II (PRU) em ratos, constataram retração dendrítica na amígdala basolateral. Essa alteração na amígdala basolateral tem uma relação direta com alteração nos níveis de corticosterona, uma vez que essa estrutura possui ligações com os núcleos hipotalâmicos que iniciam a secreção desse hormônio. Os pesquisadores

observaram que uma redução da matriz da amígdala basolateral apresenta redução dos níveis de corticosterona. Na literatura, a redução da corticosterona está relacionada a uma diminuição na ansiedade, corroborando com diversos trabalhos que verificaram uma redução da ansiedade em animais infectados pelo *T. gondii*⁵⁰,⁵¹. Todos esses mecanismos e hipóteses descritos anteriormente podem auxiliar na compreensão de como o *T. gondii* pode alterar a neurofisiologia de seu hospedeiro. Entretanto, este é um ramo da ciência que ainda carece de muitas respostas.

1.3.4 Toxoplasmose e aspectos comportamentais e neurofisiológicos: comparação entre diferentes cepas

O estudo comparativo dos efeitos comportamental e neurofisiológico de diferentes cepas de *T. gondii* em modelo murino, ainda, é escasso. O marco inicial dessa abordagem ocorreu, em 2010, com a pesquisa realizada por Kannan *et al.*⁵², que compararam o efeito da infecção de duas cepas do tipo II (PRU e ME-49) em camundongos. Os autores observaram que embora infectados com cepas do mesmo tipo, os animais apresentavam diferenças comportamentais. As mudanças comportamentais foram mais proeminentes nos animais infectados pela cepa PRU, já que estes continuaram apresentando aversão ao odor do felino mesmo em uma fase mais tardia de infecção crônica. Estes animais também tiveram maior atividade locomotora e exploratória em comparação com os animais infectados pela cepa ME-49.

Outro trabalho recente realizado por Ingram *et al.*⁶³ compararam as mudanças comportamentais decorrentes da infecção por cepas dos três tipos (I, II e III) de *T. gondii*, porém, devido a maior mortalidade apresentada pelos animais infectados pela cepa ME-49 (tipo II) este grupo foi descartado da pesquisa. Assim, os pesquisadores avaliaram apenas os animais infectados por uma cepa modificada de RH que possibilitou maior sobrevivência dos animais, já que as cepas do

tipo I são mais virulentas. Estes resultados foram comparados àqueles obtidos pela infecção com a cepa cistogênica CEP (tipo III). Foi constatado que as infecções tanto por uma cepa que não colonizava o cérebro dos animais (Rh Tipo I), como uma cepa cistogênica (CEP Tipo III), foram capazes de reduzir a aversão ao odor de felino de forma semelhante. Essa observação reforça o questionamento sobre a necessidade da presença dos cistos cerebrais como fator para o desenvolvimento de alterações comportamentais em animais infectados pelo *T. gondii*, salientando a importância da pesquisa de outros fatores que possam estar relacionados com essa questão.

A partir das pesquisas supracitadas não é possível chegar a uma conclusão definitiva da influência da diversidade genética do protozoário em relação às mudanças comportamentais em modelo animal. Contudo, estes estudos apresentam informações relevantes que abrem novas perspectivas em relação ao tema, visto que cepas geneticamente semelhantes podem apresentar efeitos comportamentais diferenciados, enquanto que cepas diferenciadas com efeito de colonização e infecção cerebral distintas podem apresentar implicações comportamentais semelhantes, indicando que provavelmente haja a influência de outros fatores, como a resposta imune no desenvolvimento de alterações comportamentais em animais infectados por *T. gondii*.

Se por um lado os estudos comportamentais, envolvendo aspectos da diversidade genética de *T. gondii*, ainda, são recentes e escassos, algumas pesquisas têm fornecido dados importantes sobre os aspectos imunológicos, neurofisiológicos e de colonização cerebral de diferentes cepas do parasita em modelo murino. Tonin *et al.*⁶⁹ avaliaram a carga parasitária e fatores relacionados à resposta imune como infiltração de células imunes no cérebro de animais infectados com cepas Rh (tipo I), ME-49 (tipo II) e VEG (tipo III). Constatando que os animais infectados pela cepa VEG mostraram maior infiltrado inflamatório e

maior número de cistos cerebrais de forma mais precoce do que os animais infectados pela cepa ME-49, porém, tanto os animais infectados com a cepa VEG como com a cepa ME-49 demonstraram aumento dos níveis de marcadores de lesão e estresse oxidativo no tecido nervoso, além de aumento dos níveis de acetilcolina e Óxido Nítrico, corroborando com os achados de Ingram *et al.*⁶³ que também constataram que animais infectados com a cepa CEP (tipo III) apresentaram maior carga parasitária e infiltrado inflamatório no SNC.

Estes resultados indicam que as infecções por cepas do tipo III são mais eficazes para colonização cerebral, provocando um processo inflamatório maior no SNC. Entretanto, devido à falta de informações relacionadas aos efeitos comportamentais das diferentes cepas, ainda, não é possível definir uma relação nítida entre essas características neurofisiológicas e o comportamento, ressaltando a importância de maiores estudos no tema.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da infecção crônica por cepas cistogênicas geneticamente distintas de *T. gondii* no comportamento de camundongos BALB/c.

2.2 Específicos

- a) Desenvolver modelos de infecção experimental em camundongos BALB/c com as cepas ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) de *T. gondii*;
- b) Avaliar por ELISA a evolução da infecção, através da resposta imune humoral específica contra peptídeos sintéticos cepa-específicos, derivados de grânulos densos GRA6 e GRA7 de *T. gondii*;
- c) Quantificar por PCR em tempo real o número de parasitas no cérebro dos animais com seis e dezesseis semanas de infecção para avaliar possível associação entre a carga parasitária de cada cepa e as alterações comportamentais;
- d) Avaliar a evolução do peso corporal dos animais ao longo do período experimental com pesagens programadas;
- e) Avaliar o efeito da infecção de cada cepa na aprendizagem e memória dos animais através do teste de Esquiva inibitória;
- f) Avaliar o efeito da infecção de cada cepa na memória espacial e aprendizagem através do teste de Labirinto de Barnes;

- g) Avaliar o efeito da infecção de cada cepa na aversão ao odor do predador (felino) através do teste de Labirinto em Y;
- h) Avaliar o efeito da infecção de cada cepa na ansiedade dos animais através do teste de Labirinto em Cruz Elevado;
- i) Avaliar o efeito da infecção de cada cepa na atividade locomotora dos animais através do teste de Campo Aberto.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c machos, com oito semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Estes animais foram divididos em três grupos, a saber: grupo controle; grupo experimental 1, infectado com a cepa ME-49, e grupo experimental 2, infectado com a cepa VEG, totalizando 90 animais. Foram separados 30 animais como grupo controle, 30 animais infectados com a cepa ME-49 e 30 com a cepa VEG. Inicialmente, um grupo de 45 animais foi mantido no biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSC-SP) para realização dos testes de Esquiva Inibitória, Labirinto de Barnes, Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto, além de avaliações imunológicas e quantificação de parasitas cerebrais. Posteriormente, outro grupo de 45 animais foi mantido no biotério do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP) para realização do teste de Labirinto em Y. Em ambos os biotérios, os animais foram mantidos em estantes ventiladas, com ar estéril e ventilação forçada, recebendo ração e água *ad libitum*, sendo alojados em gaiolas de plástico (5 animais/gaiola) contendo maravalha de pinho autoclavada. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (protocolo CPE-IMT 2013/166) (Anexo 1 e Anexo 2).

A escolha do modelo animal teve como critério a pressuposta interferência da idade e sexo no estudo comportamental. De acordo com Sakuma⁷², ratos jovens não são influenciados pelo efeito hormonal, porém na fase adulta, com o

desenvolvimento completo do animal e sua maturação sexual, as diferenças hormonais tornam-se significativas entre os gêneros e o dimorfismo sexual pode intervir no comportamento dos animais. Assim, alterações hormonais decorrentes do ciclo estral podem influenciar o comportamento das fêmeas. Por estas razões, optamos por trabalhar com camundongos BALB/c machos adultos. É interessante ressaltar, que em estudos experimentais com modelos murinos, a seleção correta da linhagem de camundongos é fundamental para o sucesso da infecção e sobrevivência dos animais na fase crônica. Assim, segundo Subauste⁷³, camundongos isogênicos BALB/c são os mais adequados para estudos de infecção crônica com cepas cistogênicas de *T. gondii*, como as cepas ME-49 e VEG, já que apresentam maior resistência à infecção oral em comparação com camundongos isogênicos C57Bl/6j.

3.2 Parasitas

As cepas cistogênicas de *T. gondii*, ME 49 (genótipo II) e VEG (genótipo III), foram mantidas no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, através de sucessivas passagens com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos Swiss não isogênicos. Os animais cronicamente infectados foram submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica e os cérebros macerados em PBS. Uma alíquota (25 µl) da suspensão cerebral foi examinada para quantificação do número de cistos em microscopia óptica convencional.

3.3 Preparação e quantificação de inóculos

Para infecção dos animais, foram utilizados cistos de *T. gondii* obtidos de cérebros de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa ME-49 ou VEG como descrito no item anterior.

Os cérebros dos animais foram retirados e colocados em uma seringa de 10 mL, na qual foram homogeneizados com 5mL de solução salina. A quantificação dos cistos foi realizada por microscopia óptica convencional e a suspensão final foi ajustada para um volume contendo 100 cistos/mL, diluídos apropriadamente em PBS, para posterior utilização nos ensaios de infecção em camundongos.

3.4 Delineamento experimental

Camundongos BALB/c foram infectados por via oral (gavage) com 10 cistos de *T. gondii*, provenientes de animais em infecção crônica com uma das duas linhagens (ME-49 ou VEG). Este número experimental permitiu que cada grupo fosse finalizado com pelo menos 07 animais, número estatisticamente significativo para o tipo de estudo, considerando a longa duração do experimento e eventuais mortalidades induzidas pela infecção. Após seis semanas de infecção, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados para quantificação de cistos, avaliação da resposta imune humoral cepa - específica e alterações comportamentais associadas à fase inicial da infecção crônica. Os animais restantes foram acompanhados por um período maior (dezesesseis semanas pós-inoculação), sendo eutanasiados ao término da segunda bateria de testes comportamentais, permitindo a comparação dos parâmetros em duas fases distintas da infecção crônica.

3.5 Testes comportamentais

Os animais foram identificados individualmente por marcação (Fig. 5) com ácido pícrico e, em seguida, foram submetidos aos testes de Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Esquiva Inibitória, Labirinto de Barnes e Labirinto em Y. A primeira fase de testes comportamentais foi realizada quando os animais estavam com seis semanas de infecção, sendo realizados todos os testes

supracitados, com exceção do Labirinto de Barnes que foi realizado apenas na segunda fase de testes. Os testes comportamentais foram realizados em laboratório específico, com portas de perfil emborrachado, constituído por duas salas de testes e uma ante-sala, ambas com iluminação semelhante à do biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, onde os mesmos foram mantidos, com exceção do teste de Labirinto em Y que foi realizado no Laboratório de Protozoologia, porém seguindo os mesmos preceitos. Tais características auxiliaram na ambientação dos animais e minimizaram a influência de fatores externos, tais como, barulho e diferença de luminosidade. Todos os testes foram iniciados no período da manhã.

Figura 5 - (A-D) Processo de marcação dos animais com ácido pícrico para identificação.

No dia das avaliações comportamentais, os animais foram levados para ante-sala (Fig. 6) com uma hora de antecedência para ambientação e foram conduzidos individualmente para a sala, onde foram realizados os testes.

Figura 6 - Período de ambientação dos animais antes da realização dos testes comportamentais (ante-sala).

3.5.1 Teste de Esquiva Inibitória

O teste de esquiva inibitória é utilizado para avaliar a aprendizagem e memória dos animais. A aprendizagem é avaliada pela inibição do comportamento exploratório dos animais em um novo ambiente, quando estes recebem um estímulo aversivo (choque) nas patas, já a memória é avaliada pelo aumento do período de latência (período em que o animal demora a entrar no compartimento em que recebeu o estímulo aversivo)^{74, 75}.

Para realização deste procedimento foi utilizado o equipamento da *Basile 7551 Passive Avoidance*, que consiste em uma caixa dividida em dois compartimentos, um iluminado e outro escuro, separados por uma porta com sistema guilhotina (Fig. 7). A metodologia utilizada foi semelhante à descrita nos trabalhos de Wang *et al.*^{76, 77}, porém com algumas modificações. O experimento foi dividido em três partes: a primeira consistiu em um treinamento, a segunda avaliou a capacidade de aprendizagem dos animais (90 min. após o treino) e a última, avaliou a memória (24 h após o treinamento).

No período de treinamento, os animais foram colocados no aparelho no compartimento iluminado, com a cabeça voltada para a porta de acesso ao compartimento escuro, sendo contados 2 s para a abertura da porta que separa as duas regiões (clara e escura). O tempo máximo que cada animal tinha para entrar no compartimento escuro (latência) era de 5 min, sendo que ao entrar na parte escura do aparato, o mesmo recebia um choque de 5 mA com 2s de duração. Imediatamente após levar o choque, o camundongo era retirado do aparato e levado para a gaiola de descanso. Apenas a latência foi observada e os animais que não entraram no compartimento escuro no decorrer dos 5 min foram devolvidos na caixa de descanso.

Para avaliar a capacidade de aprendizagem, 90 min após o treino, os animais foram submetidos ao procedimento descrito anteriormente. Já o teste que visou a avaliação da memória foi feito 24 horas após a etapa anterior, sendo obedecidos os mesmos procedimentos já descritos. Entre cada teste o aparato foi higienizado com etanol 5%, evitando, assim, a influência do odor no comportamento do próximo animal a ser testado.

Figura 7 - Esquiva Inibitória. (A) vista frontal do aparato. (B) Vista superior do aparato, ressaltando a diferença entre o compartimento claro e escuro, a corrente elétrica (choque) foi transmitida ao animal através da grade de ferro.

3.5.2 Teste Labirinto de Barnes

O teste do Labirinto de Barnes foi realizado somente na segunda fase de testes comportamentais, com o restante dos animais que não foram eutanasiados na primeira fase. O aparato foi utilizado para avaliar a memória espacial e aprendizagem como proposto por Goodwin *et al.*⁵⁴. Para tal procedimento, foi utilizado um aparato que consiste em uma plataforma circular aberta (100 cm de diâmetro) com 31 pequenos orifícios (5 cm de diâmetro cada) que circundam a borda do aparelho. O mesmo foi elevado 1 m do chão e apresentava quatro pistas visuais que auxiliaram os animais a encontrarem a caixa de escape acoplada abaixo de um dos orifícios (Fig. 8).

Figura 8 - Labirinto de Barnes. (A) Vista superior do Labirinto de Barnes. (B-E) pistas visuais. (F) caixa de escape acoplada sob um dos orifícios do aparato.

Em relação à duração do teste, o mesmo seguiu os parâmetros preconizados por Sunyer *et al.*⁷⁸, incluindo quatro dias consecutivos de treinamento e realização do teste 24 horas após o último treinamento.

A metodologia de execução do treinamento e teste foi semelhante à empregada por Goodwin *et al.*⁵⁴, com pequenas modificações. No primeiro dia foram realizados o treino (5 min), seguido de reforço (1 min), sendo que após 2 hs, os animais foram submetidos novamente ao treino de 5 min. Nos outros três dias foram realizados apenas os dois treinos diários de 5 min cada, com intervalo de 2 hs entre eles. O treino consistiu em colocar o animal no centro do aparato, contido por 1 min em uma pequena caixa de acrílico, com luz e ventilador ligados. Após esse período, o animal foi liberado para circular na arena por 5 min. Durante esse tempo, foram observados os seguintes critérios: latência para encontrar a toca, latência para entrar na toca e número de orifícios observados (erros) antes e depois de encontrar a toca. Se, no decorrer do teste, o animal entrasse na caixa (toca) antes do tempo máximo estabelecido, ou se ele não entrasse durante este período na toca, ele era recolocado dentro da toca por um período de 1 min com luz e ventilador desligados. Apenas no primeiro dia de teste foi realizado um reforço no primeiro treino que consistiu em retirar o animal da caixa de escape e o mesmo foi devolvido ao centro do aparato e deixado para explorar o sistema por mais 1 min. Em caso de entrada antes do término do tempo máximo estabelecido, ou a não entrada até o término do tempo, os animais eram recolocados na toca durante 1 min.

Foram realizados dois treinos diários, com duas horas de intervalo entre eles, durante os quatro dias iniciais e no quinto dia, o teste foi realizado. Além disso, para avaliar a retenção de memória de longo prazo, os animais foram novamente submetidos à um teste com uma semana de intervalo do teste inicial.

3.5.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O Teste de Labirinto em Cruz Elevado é um modelo amplamente utilizado para avaliação da ansiedade e consiste em um aparato contendo dois braços fechados (paredes) e dois braços abertos. Este teste leva em consideração o receio dos animais em explorarem ambientes novos que possam expô-los a situações de perigo⁷⁹. O tempo de permanência no braço aberto em relação ao fechado é um dado crucial para avaliação da ansiedade do animal⁵⁰.

Para este procedimento os animais foram colocados individualmente em uma estrutura de madeira contendo quatro braços com 50 x 10 cm de dimensão. Apenas os braços fechados possuíam uma parede de 40 cm, configurando, assim, dois braços abertos cruzados por dois braços fechados, sendo que a área central apresentava 10 x 10 cm de dimensão (Fig. 9 A). Todo o aparelho foi elevado a 50 cm do solo. Cada animal foi colocado na região central, com a cabeça voltada para um braço aberto e liberado para explorar a arena durante 5 min. Durante esse período, foram contabilizados o número de entrada do animal em cada braço e o tempo de permanência nos mesmos e na área central, sendo considerada uma entrada quando o animal mantinha mais da metade do corpo dentro do braço. Também foi calculado o número de “*head dipping*”- HD (movimentos exploratórios com a cabeça voltada para baixo) no braço aberto, além da entrada no fundo dos braços abertos e fechados. Foi considerada entrada no fundo do braço, quando o animal passava da metade da área do braço em questão (Fig. 9 B). Essas duas últimas variáveis foram contabilizadas manualmente.

Entre cada teste, o aparelho foi higienizado com etanol 5% para que eventuais odores não afetassem o teste posterior. Todo o procedimento foi filmado com a câmera digital *Lumix Panasonic DMC-FZ47*, para posterior análise das imagens e contabilização de parte dos dados através do software *PluzMZ*.

Figura 9 - Labirinto em Cruz Elevado. (A) labirinto vista superior. (B) Exemplo de uma entrada no fundo de um braço fechado, destaque (linha vermelha) para o critério de entrada ao fundo do braço do aparato, o mesmo critério foi adotado nos demais braços do aparelho.

3.5.4 Teste de Campo Aberto

O Teste de Campo Aberto ou “*Open Field*” tem como objetivo avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais ao serem inseridos em um ambiente desconhecido⁷⁹. As principais variáveis avaliadas foram atividade horizontal, descrita através da quantificação da locomoção; atividade vertical, que foi avaliada pelo número de vezes que o animal se manteve em posição vertical, apoiado nas paredes do aparelho, e a distância do centro do campo⁸⁰.

Para a realização do mesmo, foi utilizado o actômetro *Basile 47420 Multiple Activity Cage*, com 41 x 41 x 33 cm de tamanho (Fig. 10). Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e tiveram cinco minutos para explorar o ambiente. Durante esse período, foram observados os movimentos horizontais, verticais (ambos registrados por sistema sensorial com infra-vermelho), tempo de

auto limpeza (*Grooming*), tempo de imobilidade e quantidade de *pellets* fecais. Estas últimas variáveis foram registradas manualmente.

Entre cada teste, o aparelho foi higienizado com etanol 5% para que odores não interferissem no comportamento do animal avaliado posteriormente. Todos os ensaios foram filmados com a utilização da câmera digital *Lumix Panasonic DMC-FZ47*.

Figura 10 – Actômetro. (A) Foto do actômetro, destaque (seta vermelha) para os sensores laterais que detectaram os movimentos horizontais e verticais; (B) Detalhe do aparelho que registrou os dados obtidos pelos sensores.

3.5.5 Teste de Labirinto em Y

Para avaliação da aversão dos animais ao odor do predador (felino), utilizamos o labirinto em Y, que consiste em uma plataforma de madeira com o formato de Y elevada a 31 cm do chão (Fig. 11). O aparato apresenta três braços idênticos com 35 cm de largura, 5 cm de espessura e 10 cm de altura. Para realização dos testes o labirinto foi revestido por uma camada de maravalha para conforto dos animais. O teste foi dividido em duas fases, a primeira de treinamento, na qual, o animal foi colocado em uma área de contenção do aparato, permanecendo por 120 s, e depois foi liberado para familiarização do equipamento por 300 s conforme metodologia preconizada por Kavaliers *et al.*⁸¹. A aversão dos

animais ao odor do predador foi avaliada em dois testes independentes, sendo que no primeiro teste, foi utilizada urina pura de gatos domésticos adultos, e no segundo, L-felinina, que é um aminoácido presente na urina de felinos, sendo responsável pelo odor característico desta urina. Os testes foram realizados 24 horas após o treino utilizando a mesma metodologia, apenas com a adição de um sachê contendo 1 g de maravalha limpa em um braço e um sachê contendo 1 g de maravalha com 1 mL de urina pura de gato, ou 1 mL de solução contendo 0,05% de L-felinina (*Toronto Research Chemicals*) no braço oposto como preconizado por Voznessenskaya⁸². Os parâmetros avaliados foram latência para entrada em um braço, número de visitas e tempo de permanência em cada braço^{81, 83}. Após cada teste, o aparato foi limpo com álcool 5% visando remover vestígios olfativos. O teste de labirinto em Y foi realizado com seis e dezesseis semanas pós-infecção. Todos os ensaios foram filmados com a utilização da câmera digital *Lumix Panasonic DMC- FZ47*.

Figura 11 - Labirinto em Y, sinalização vermelha (área de contenção).

3.6 Avaliação da resposta imune humoral

Para avaliação da resposta imune humoral dos animais foi realizada a detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*, utilizando microplacas de ELISA (placa de 96 poços de poliestireno, *Sigma*®), previamente revestidas com 100 µL / poço de uma solução contendo 10 µg /mL de extrato antigênico de *T. gondii* diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5. As placas foram incubadas *overnight* a 4 °C e, em seguida, lavadas três vezes com solução salina tamponada de fosfato (PBS), contendo 0,03 % de Tween 20 (PBST) e bloqueadas durante 1 hora a 37 °C com PBS contendo 3 % de leite em pó desnatado (*Molico*®). Após esta etapa, 100 µL de amostras de soro diluídas a 1:100 em PBST foram adicionadas em cada poço e a placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C em estufa. Após lavagem adicional com PBST, foram adicionados 100 µL de conjugado anti - IgG de camundongo marcado com peroxidase (*Sigma*®) na diluição de 1:5000 e as placas foram mantidas por 1 hora a 37 °C. Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5,8, contendo OPD 0,4mg/mL e H₂O₂ 0,03%, por 30 min em câmara escura, seguida de bloqueio pela adição de HCl 4 N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas (*Labsystems Multiskan MS*) a 492 nm. Em cada placa foram testados soros controles positivo e negativo.

3.7 Avaliação da resposta imune humoral cepa - específica

3.7.1 Peptídeos sintéticos cepa - específicos

Para avaliação da resposta imune humoral cepa - específica foram utilizados três peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos das proteínas de grânulos densos GRA6 e GRA7 de *T. gondii* e uma sequência controle previamente descritos

por Kong *et al.*⁸⁴ e Sousa *et al.*^{85, 86}. O peptídeo denominado GRA6II (LHPGSVNEFDF) apresenta polimorfismo específico para cepas tipo II. A sequência (LHPERVNVFDY), definida como GRA6 I/III, é derivada de um epítopo de GRA6 de cepas do tipo I e III, o peptídeo GRA7III (PEHEVPESGEDREDARQ) apresenta polimorfismo específico para cepas do tipo III. Além destes peptídeos, foi utilizada a sequência (EVVHDYRLFNP), caracterizada como controle. Todos os peptídeos que foram utilizados foram sintetizados pela *Invitrogen*®, apresentando 70% de grau de pureza.

3.7.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) com peptídeos sintéticos cepa - específicos

A reação foi realizada de acordo com a metodologia preconizada por Sousa *et al.*⁸⁷, com pequenas modificações. Brevemente, placas de 96 poços revestidas com ligantes de aminas primárias (*Immobilizier amino plates, Nunc*®) foram sensibilizadas com 10 µg / mL de cada peptídeo (100 µL / poço) suspensos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 por 20hs a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes, por 5 min cada, com PBS 0,02 M pH 7,2 contendo 0,3% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 3% de BSA em PBST durante 1 hora em estufa a 37°C. Após bloqueio e 3 lavagens com PBST, as amostras de soros na diluição 1:50 (100 µL / poço) foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após três novas lavagens, cada poço recebeu 100 µL de conjugado anti - IgG de camundongo marcado com peroxidase (*Sigma*®) na diluição de 1:5000 e as placas foram mantidas por 1 hora a 37 °C. Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução de citrato de sódio 0,05 M pH 5,8, contendo OPD 0,4 mg / mL e H₂O₂ 0,03%, por 30 min em câmara escura, seguida de bloqueio pela

adição de HCl 4 N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas (*Labsystems Multiskan MS*) a 492 nm.

3.8 Quantificação de parasitas cerebrais

3.8.1 Extração e purificação do DNA para PCR em tempo real

A extração de DNA das amostras de cérebro de camundongos infectados com as cepas cistogênicas ME 49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) e de amostras de lavado peritoneal de camundongos infectados com a cepa RH (Tipo I) foi realizada com kit comercial de extração *QIAamp DNA*, *Qiagen*[®] de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, sendo extraídos 180 µL de cada amostra. O DNA de cada amostra foi suspenso em 100 µL de TE e armazenado a - 20 °C até a utilização na PCR em tempo real.

3.8.2 Quantificação de parasitas cerebrais de camundongos BALB/c por PCR em tempo real

A quantificação dos parasitas cerebrais de camundongos BALB/c após infecção com diferentes linhagens de *T.gondii* foi realizada por PCR em tempo real (qPCR), utilizando-se o aparelho *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System*. As reações foram realizadas com um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de SYBR Green Mix (*Invitrogen*[®]), 1 µL de cada primer (sense: GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG) e (antisense: TTCTCGCCTCATTTCTGGGTCTAC) a 10µM; 5 µL de DNA e 6,5 µL de água ultrapura estéril. As amplificações foram realizadas com 2 controles negativos (água ultrapura e DNA de tecido cerebral de camundongos negativos para *T.gondii*) e um controle positivo (DNA extraído da cepa RH de *T.gondii*). As amplificações foram

realizadas com uma temperatura inicial de 50 °C por 2 min, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Todas as amostras foram testadas em triplicatas. O sistema *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR* verificou o sinal fluorescente a cada segundo da reação e calculou automaticamente o *mean baseline* (ou *baseline fluorescence*), ou seja, o “sinal de fundo” da fluorescência gerado durante os ciclos iniciais da qrtPCR. Com base nesta “fluorescência de fundo”, foi possível detectar com acurácia a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado, denominado CT (*threshold cycle*). O CT foi definido como o ciclo em que a fluorescência excedeu estatisticamente o *mean baseline*, sendo proporcional ao acúmulo de DNA alvo presente na amostra, representando a mesma quantidade de produtos amplificados presentes no tubo.

3.8.3 Determinação do limite de detecção

Para determinar o limite de detecção da reação de qrtPCR foi realizada uma curva padrão em diluições seriadas de DNA extraído de taquizoítos da cepa RH de *T.gondii* provenientes do lavado peritoneal de camundongos Swiss, previamente infectados com 10^6 parasitas / mL. Os pontos da curva foram determinados por concentrações de 10^7 a 10^1 taquizoítos. Os CTs obtidos foram plotados em relação às diferentes concentrações de parasitas. O número de parasitas foi calculado pelo valor do CT, pela equação de regressão linear, $y = ax+b$, onde: $y = CT$; $a =$ inclinação da curva (*slope*); $x =$ número de parasitas; $b =$ intercepção do eixo y , obtendo-se, assim, a curva padrão que foi utilizada para quantificação de DNA de *T.gondii* presente nos cistos cerebrais dos animais experimentais.

3.9 Análise Estatística

Para comparação de frequências, foi utilizado o teste do Chi quadrado, na presença de caselas superiores a 3. Na ausência destas, foi utilizado o teste exato de Fisher. Para comparação de valores individuais entre grupos utilizamos o teste de ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, na presença de homogeneidade de variâncias. Na ausência desta, foi usado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn's. Foram consideradas significantes diferenças, cuja probabilidade de igualdade foi menor que 0.05 ($p < 0.05$). Em ensaios com medida temporal de desfechos, que podiam ou não ocorrer, foi usado o teste de Kaplan Meier. Toda a análise foi feita utilizando o pacote estatístico Graphpad Prism 5.0.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da resposta imune humoral por ELISA

4.1.1 Detecção de anticorpos totais

Figura 12 - Resultados para detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*. Dados expressos com média $\pm$ SEM. F = 501.1; df = 17; *p<0,05 e ** p<0,01 ANOVA.

Para avaliação da resposta imune humoral induzida pelas cepas infectantes ME - 49 (tipo II) e VEG (tipo III) foi realizado o teste de ELISA com extrato proteico solúvel de *T. gondii* para a detecção de anticorpos IgG contra o parasita (Fig. 12). O primeiro grupo representa os animais eutanasiados logo após a primeira bateria de testes comportamentais que foi realizada com seis semanas após a infecção. O segundo grupo representa os animais eutanasiados após a segunda bateria de testes que foi realizada com dezesseis semanas após a infecção. A produção de anticorpos IgG anti - *T.gondii* foi maior no grupo infectado com a cepa VEG em relação à cepa ME - 49 nos dois períodos avaliados (p< 0,05 com seis semanas e p< 0.01 com dezesseis semanas).

4.1.2 Detecção de anticorpos cepa-específicos

Figura 13 - Resultados para detecção de anticorpos contra peptídeos sintéticos cepa-específicos. Dados expressos com média $\pm$ SEM. $F = 108.26$; $df = 23$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA.

Para avaliação da resposta imune humoral específica foi realizado o teste de ELISA com peptídeos sintéticos cepa-específicos. A Figura 13 apresenta os resultados obtidos pela análise do soro dos animais com diferentes peptídeos como descrito em métodos. Os animais infectados pela cepa VEG apresentaram maiores títulos de anticorpos contra o peptídeo GRA6 I / III, que é específico para esta cepa, quando comparado com o grupo ME - 49 ($p < 0,001$). Da mesma forma, os animais infectados com a cepa ME - 49 apresentaram maiores níveis de anticorpos contra o peptídeo GRA6 II, específico para esta cepa, quando comparados ao grupo VEG ($p < 0,01$).

4.2 Quantificação de parasitas cerebrais por PCR em tempo real

Figura 14 - Quantificação do número de parasitas cerebrais de *T. gondii* por PCR em tempo real. Dados expressos com média $\pm$ SEM. $F = 23.41$; $df = 21$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA.

A quantificação de parasitas nos cérebros de animais infectados pelas cepas ME - 49 e VEG foi realizada por PCR em tempo real em grupos de animais com seis e dezesseis semanas de infecção. Como podemos observar na Figura 14 não houve diferença estatística significativa entre o número de parasitas cerebrais para ambas as cepas com seis semanas pós - infecção. Entretanto, a cepa VEG (tipo III) induziu um maior número de parasitas cerebrais em relação à cepa ME-49 (tipo II) após dezesseis semanas de infecção ($p < 0,001$).

Comparando os dois períodos, é possível verificar que o número de parasitas no SNC decorrente da infecção pela cepa VEG aumentou significativamente ao longo do tempo ($p < 0.01$). Não houve diferença entre o número de parasitas da cepa ME - 49 nos dois períodos observados.

4.3 Pesagem dos Animais

Figura 15 – Peso médio dos animais ao longo do período experimental (gramas). Pontos azul correspondem aos períodos dos testes comportamentais. Dados expressos com média $\pm$ SEM. $F = 11.64$; $df = 84$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA.

No período inicial do experimento, não houve diferença significativa em relação ao peso corporal dos animais entre os diferentes grupos (Fig. 15). Contudo, verificou-se uma redução do peso corporal, em ambas as infecções, após quinze dias de infecção, sendo esse efeito mais evidente na infecção pela ME - 49 ($p < 0,001$), do que na infecção pela cepa VEG ($p < 0,05$). Essa redução se manteve após trinta dias de infecção. Já na infecção pela cepa VEG, é possível verificar uma diferença acentuada no peso corporal dos animais infectados, em relação ao grupo controle, com resultados mais significativos a partir do 60º dia de infecção ($p < 0,001$), mantendo-se até o final do período experimental.

Ao avaliar a evolução do peso corporal de cada grupo, é interessante notar que o grupo controle apresentou aumento do peso corporal após sessenta dias de experimentação em relação ao período inicial, característica essa que se manteve até o final ($p < 0,001$) (Fig. 16 A). Já os animais infectados pela cepa ME - 49 apresentam uma redução do peso corporal quinze dias pós - infecção ($p < 0,001$),

recuperando a faixa de peso inicial nos demais períodos observados (Fig. 16 B). Os animais infectados pela cepa VEG não apresentaram alteração no peso corporal em relação ao período inicial do estudo (Fig. 16 C).

Figura 16 – Peso dos animais ao longo do período experimental (gramas) por grupo. (A) grupo controle; (B) grupo ME-49; (C) grupo VEG. Dados expressos com média $\pm$ SEM. $F = 11.64$; $df = 84$; $***p < 0,001$ ANOVA.

A partir destes dados é possível afirmar que as infecções, por ambas as cepas, não causam redução do peso corporal dos animais em comparação com o peso dos mesmos no início do experimento, sendo esse efeito observado apenas na fase inicial da infecção pela cepa ME - 49 ($p < 0.001$), porém é interessante notar que os animais infectados não ganharam peso como o grupo controle, que é um efeito aparentemente comum nessa faixa etária do animal.

4.4 Testes Comportamentais

4.4.1 Teste de Esquiva Inibitória

A Figura 17 apresenta os dados referentes às latências de cada grupo experimental nos diversos testes de Esquiva Inibitória, nos quais pode-se observar que o grupo ME - 49 apresentou uma latência significativamente menor que a do grupo controle ($p < 0,05$) e do grupo VEG ($p < 0,0001$) no treino, podendo ser um indicativo de que esses animais são mais responsivos a procurar um ambiente confortável e escuro, lembrando que nessa etapa os animais não tinham a referência do estímulo aversivo - choque. Nas demais mensurações não houve diferença significativa entre os grupos, com exceção do primeiro teste de recuperação de memória de longa duração, realizado dois meses após a primeira bateria de testes comportamentais, no qual apenas o grupo VEG apresentou uma latência significativamente menor ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle, indicando que a infecção por esta cepa pode ocasionar uma possível dificuldade de recuperação de memória de longo prazo.

Figura 17 - Resultados do Teste de Esquiva Inibitória, referente à latência que os animais apresentaram para entrar no compartimento escuro. Treino, Memória T- 90 min (teste realizado 90 min após o treino), Memória T- 24h (teste realizado 24 horas após o treino), Recmen T(2) (teste realizado 2 meses após o treino – recuperação de memória). F 3.960; df = 41 *** $p < 0,001$ e F 3.959; df = 26 * $p < 0,05$ – ANOVA.

A Figura 18 apresenta os dados referentes ao número de entradas de cada grupo na área escura e a permanência dos animais na região clara para os diferentes testes de Esquiva Inibitória.

Figura 18 - Número de entradas por grupo experimental nos Testes de Esquiva Inibitória. Barras cinzas (número de animais que entraram no compartimento escuro) e Barra branca (número de animais que não entraram no compartimento escuro). Treino, Memória T- 90 min (teste realizado 90 min após o treino), Memória T- 24h (teste realizado 24 horas após o treino), Recmen T(2) (teste realizado 2 meses após o treino – recuperação de memória). Chi-square 9.376, df = 20 $**p < 0,001$ -Chi quadrado.

Na primeira bateria de testes, pode-se observar que para todos os grupos houve tendência de diminuição do número de entradas no compartimento escuro. No início do treino, a maioria dos animais entrou no compartimento escuro, sofrendo, assim, a descarga elétrica pela primeira vez, porém, nos demais testes, pode-se observar uma diminuição gradual do número de entradas neste compartimento e aumento do número de animais que permaneceram no compartimento iluminado (barras brancas). Já, quando foi realizado o primeiro teste de recuperação de memória de longo prazo, após dois meses de intervalo da primeira bateria de testes comportamentais, pode-se perceber que o grupo controle apresentou menor número de entradas no compartimento escuro em comparação com os grupos de animais infectados (ME - 49 e VEG), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$). Esses dados sugerem que ambos os grupos infectados podem apresentar alguma alteração na recuperação da memória.

A Figura 19 mostra de forma detalhada a porcentagem de animais que entraram no compartimento escuro em relação ao tempo de latência de entrada neste compartimento. A Figura 19 D, referente ao teste realizado após 2 meses de intervalo, indica que as duas cepas infectantes alteraram de alguma forma a recuperação de memória, uma vez que o número de entradas dos animais infectados é significativamente maior do que o controle.

Figura 19 - Gráficos de proporção de entradas no compartimento escuro em relação à latência (s). (A) Treino; (B) Memória T- 90 min; (C) Memória T- 24h; (D) Recmen T(2) (teste realizado 2 meses após o treino – recuperação de memória). Chi square – 8.435; df = 2; * p< 0,05 - Kaplan Meier.

4.4.2 Teste de Labirinto de Barnes

O teste do Labirinto de Barnes foi utilizado para avaliação da aprendizagem e memória espacial. Inicialmente, os animais foram submetidos a uma fase de treinamento de quatro dias consecutivos, sendo expostos duas vezes ao dia ao Labirinto de Barnes. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos na

etapa de treinamento, sendo que o T1 representa os dados referentes ao treino realizado no período matinal e o T2 representa os dados referentes ao período vespertino de cada dia. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os treinos, nem entre os grupos em relação à latência para encontrar e entrar na toca e o número de erros antes e após achar a mesma.

Figura 20 - Gráficos de proporção de animais em relação às latências e erros obtidos no treinamento do Teste de Barnes. (A) Proporção de animais que acharam a toca em relação à latência; (B) Proporção de animais que entraram na toca em relação à latência de entrada; (C) Proporção de animais em relação ao número de erros antes de achar a toca e (D) Proporção de animais em relação ao número de erros após achar a toca (Treinos). T1. Treinamento 1; T2. Treinamento 2. Os dados foram obtidos por Kaplan Meier.

Após a etapa de treinamento e ambientação no Labirinto de Barnes, os animais foram submetidos aos testes propriamente ditos. A bateria de testes foi dividida em dois períodos, sendo que um teste (teste 1) foi realizado um dia após o término do período de treinamento, e o outro teste (teste 2) foi realizado uma semana após o teste 1 para avaliar a memória de longo prazo. A Figura 21

apresenta os resultados obtidos nos dois dias de teste em relação às latências para achar e entrar na toca. Não houve diferença estatística significativa em relação a esses parâmetros entre os grupos (Fig. 21 A e B, C e D).

Figura 21 - Gráficos de proporção de animais em relação às latências (achar e entrar na toca) apresentados nos Testes 1 e 2 no Teste de Barnes. (A). Teste 1; proporção de animais que acharam a toca em relação à latência; (B). Teste 2; proporção de animais que acharam a toca em relação à latência; (C). Teste 1; proporção de animais que entraram na toca em relação à latência de entrada; (D). Teste 2; proporção de animais que entraram na toca em relação à latência de entrada. Kaplan Meier.

Por fim, quando comparamos o número de erros antes e após o encontro da toca nos dois testes, não detectamos alterações significativas entre os grupos (Fig. 22 A, B, C e D). No referido teste não foi observada a influência da infecção parasitária em relação a capacidade de aprendizagem e memória espacial.

Figura 22 - Gráficos de proporção de animais em relação aos erros (antes e depois de achar a toca) apresentados nos Testes 1 e 2 no Teste de Barnes. (A). Teste 1; proporção de animais em relação ao número de erros antes de achar a toca; (B). Teste 2; proporção de animais em relação ao número de erros antes de achar a toca; (C). Teste 1; proporção de animais em relação ao número de erros após achar a toca; (D). Teste 2; proporção de animais em relação ao número de erros após achar a toca. Kaplan Meier.

4.4.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O Teste de Labirinto em Cruz Elevado foi aplicado em dois períodos distintos da infecção crônica dos animais (teste1 e teste 2). O teste 1 foi realizado após seis semanas de infecção e o teste 2, após dezesseis semanas de infecção. Inicialmente, foi avaliado o tempo em que cada grupo permaneceu nas áreas aberta, fechada e central do labirinto.

Na Figura 23 (teste 1) pode-se observar que para os grupos controle e ME - 49 não foram observadas diferenças entre o período em que os animais permaneceram na região aberta em relação à fechada. Já, os animais infectados com a cepa VEG apresentaram uma permanência significativamente maior na região do braço fechado em relação ao braço aberto ($p < 0.05$). No teste 2, todos os grupos demonstraram maior ocupação no braço fechado em comparação com o braço aberto do labirinto ($p < 0,0001$).

Figura 23 - Tempo de ocupação por área (aberta, fechada e central) em segundos - Labirinto em Cruz Elevado. Teste 1 realizado com seis semanas após a infecção e Teste 2 realizado com dezesseis semanas após a infecção. Dados expressos com média ± SEM F – 22.13; df = 190; *** ($p < 0,0001$) e * ($p < 0,05$) ANOVA.

As observações realizadas acima são confirmadas quando os dados são demonstrados em porcentagem, como pode ser verificado na figura abaixo (Fig. 24).

Figura 24 – Porcentagem de tempo gasto em cada área do Labirinto em Cruz Elevado em relação ao período total do teste. Dados expressos com média $\pm$ SEM. (A) seis semanas P.I, $F = 20.13$; $df = 125$; $***p < 0,001$; (B) dezesseis semanas P.I; $F = 571.81$; $df = 80$; $***p < 0,001$ ANOVA.

O segundo critério avaliado no teste de labirinto em cruz elevado foi o número de entradas em cada região do labirinto (aberta, fechada e central).

Figura 25 – Número de entradas por área no Labirinto em Cruz Elevado. (A) - número de entradas na área aberta do Labirinto em Cruz Elevado; (B) – número de entradas na área central do labirinto e (C) – número de entradas na área fechada. 1. Dados referentes ao primeiro teste e 2 dados referentes ao segundo teste. F 11.80; df 206; *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ - ANOVA.

Como podemos observar na Figura 25 A, o grupo VEG foi o único que apresentou diferença significativa em relação ao número de entradas na área aberta do labirinto ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. Ao analisarmos a área central do labirinto, verificamos uma diferença do número de entradas do grupo controle em relação aos animais infectados pela cepa VEG ($p < 0,0001$) no primeiro teste. Resultados semelhantes foram observados em relação à cepa ME – 49, quando comparados com a VEG ($p < 0,001$) (Fig. 25 B). Já no braço fechado, o número de entradas do grupo VEG foi diferente em relação ao número de entradas

do grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 25 C). Tais resultados indicam que os animais infectados pela cepa VEG, provavelmente, apresentam menor mobilidade do que os grupos controle e ME - 49 na fase inicial da infecção crônica. Já no teste 2, não foram observadas diferenças entre os grupos para todas as regiões do aparato (aberta, fechada e central). Não houve diferença do número de entradas entre os braços abertos e fechados dentro de cada grupo no teste 1, porém, no teste 2, a exceção foi o grupo ME - 49 que apresentou um número de entradas no braço fechado estatisticamente superior ao braço aberto ($p < 0,05$).

Esses dados são confirmados quando analisamos o número de entradas em cada região do aparato por porcentagem, como demonstrado na figura 26 (A e B). A análise estatística foi realizada com base apenas nos dados do braço aberto *versus* o braço fechado.

Figura 26 – Porcentagem do número de entradas por braço do aparato no Teste de Labirinto em Cruz Elevado em relação a movimentação total dos grupos. Dados expressos com média $\pm$ SEM. (A) seis semanas P.I; $F = 104.48$; $df = 125$; (B) dezesseis semanas P.I; $F = 43.73$; $df = 80$ * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ ANOVA.

O terceiro critério avaliado no teste de Labirinto em Cruz Elevado foi o número de entradas no fundo do braço aberto e fechado. Como podemos observar na Figura 27, o grupo VEG apresentou um número significativamente menor de entradas nas extremidades dos braços abertos em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa ao compararmos o número de entradas na extremidade do braço aberto no segundo teste. Quando

comparamos os grupos experimentais não obtivemos diferenças significantes no número de entradas nas extremidades dos braços fechados nos dois testes.

Figura 27 - Número de entrada nas extremidades dos braços do Labirinto em Cruz Elevado dos diferentes grupos nos testes 1 e 2. F – 9.378; df = 135 * $p < 0,05$ - ANOVA.

Ao compararmos o número de movimentos exploratórios (*Head-dipping* – HD) dos animais no braço aberto (Fig. 28) notamos que, somente o grupo VEG (teste 1) apresentou uma diferença em relação ao grupo controle (teste 1) ($p < 0,001$). No teste 2, não houve diferença entre os grupos.

Figura 28 - Gráfico do número de *Head-dipping* dos animais nos testes de Labirinto em Cruz Elevado. (1 – dados referentes ao primeiro teste e 2 dados referentes ao segundo teste). F - 11.45; df = 68; ** $p < 0,001$ - ANOVA.

4.4.4 Teste de Campo Aberto

Inicialmente, o Teste de Campo Aberto avaliou o tempo de imobilidade dos animais. Como podemos observar na Figura 29 os animais inoculados com a cepa VEG apresentaram maior tempo de imobilidade que o grupo controle ($p < 0,05$). O segundo critério avaliado pelo teste de Campo Aberto foi o número de movimentos verticais e horizontais dos animais no aparelho. A Figura 30 mostra que os animais do grupo VEG obtiveram menor movimentação do que o grupo controle tanto nos movimentos horizontais ($p < 0,0001$), como nos movimentos verticais ($p < 0,001$), no teste 1, aplicado com seis semanas após infecção. Já para o teste 2, aplicado dezesseis semanas após infecção, os animais do grupo VEG apresentaram menor número de movimentos verticais quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$) e ME-49 ($p < 0,05$).

Figura 29 - Tempo de Imobilidade dos grupos experimentais no Teste de Campo aberto. Teste 1 realizado com seis semanas após a inoculação e Teste 2 com dezesseis semanas após a inoculação. F - 2.652; df = 68; * p<0,05 – ANOVA.

Figura 30 - Movimentos Horizontais e Movimentos Verticais obtidos no Teste de Campo Aberto. Teste 1 realizado com seis semanas após a inoculação e Teste2 com dezesseis semanas após a inoculação. (A) Movimentos Horizontais. F - 19.08; df = 208; *** p<0,0001; F - *5.316; df = 209* p<0,001 e (B) Movimentos Verticais. F - 2.553; df =134 **p<0.001 * p<0,05 – ANOVA.

Ao considerarmos os resultados obtidos pelo Teste de Labirinto em Cruz Elevado, no que diz respeito ao número de entradas, mais os dados obtidos pelo presente teste (Campo Aberto), podemos inferir que a mobilidade dos animais infectados pela cepa VEG (tipo III) foi mais afetada do que a mobilidade dos

animais infectados pela cepa ME – 49 (tipo II), uma vez que, os primeiros apresentaram menor número de entradas nas diferentes regiões do Labirinto em Cruz Elevado e menor número de movimentos horizontais, verticais e maior tempo de imobilidade no Teste de Campo aberto.

Figura 31 - Movimentos Horizontais e Verticais, avaliação minuto-a-minuto no teste de Campo Aberto; **(A)** Movimentos Horizontais por minuto (5min) obtidos no Teste 1, F- 13.82; df = 208; * p<0,05; **(B)** Movimentos Horizontais por minutos obtidos no Teste 2; **(C)** Movimentos Verticais por minuto verificados no Teste 1 e **(D)** Movimentos Verticais por minuto averiguados no Teste 2. ANOVA.

Um terceiro critério avaliado no teste de Campo Aberto foi a movimentação dos diferentes grupos no decorrer do tempo, sendo realizada uma avaliação minuto-a-minuto com o objetivo de analisar a ambientação dos animais no aparato. Quanto à ambientação, esta é descrita como uma queda da movimentação (principalmente horizontal) dos animais ao longo do teste, visto que, no início, os animais se movimentam mais pelo fato de estarem explorando o

ambiente novo. Com o decorrer do tempo, os animais ficam habituados e com isso o número de movimentos tende a diminuir. No teste 1, ao verificarmos a movimentação horizontal dos grupos (Fig. 31 A) podemos observar que todos os grupos apresentaram uma queda significativamente relevante de movimentação do primeiro minuto em relação ao segundo ($p < 0,05$), indicando que todos os grupos apresentaram uma tendência parecida de ambientação à arena. Nos demais minutos não houve diferença de movimentação dentro de cada grupo. Já, no teste 2 (Fig. 31 B), não foi observado o mesmo padrão, sendo que em alguns casos houve um aumento do número de movimentos no decorrer do tempo. Este aspecto pode ser relacionado ao fato de que no teste 2 o aparato já era um ambiente conhecido dos animais.

Em relação aos movimentos verticais, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significantes minuto-a-minuto dentro de cada grupo, pode-se notar, principalmente, no grupo controle (Fig. 31 C e D) uma tendência de aumento gradual deste tipo de movimentação ao longo do teste. Assim, é possível constatar, neste grupo, que os movimentos verticais foram inversamente proporcionais aos movimentos horizontais, já que aumentaram com o decorrer do tempo. Nos grupos de animais infectados (ME - 49 e VEG) não foi possível notar este padrão.

Por fim, foram avaliados o comportamento de *grooming* ou auto-limpeza dos animais e a quantidade de pellets fecais (Fig. 32 A e B) durante o período de teste e não foram observadas diferenças entre os grupos nesses quesitos, embora tenha ocorrido uma tendência de diminuição de *grooming* nos animais infectados pela cepa VEG em comparação com os demais grupos.

Figura 32 – Tempo de *grooming* e quantidade de pellets fecais no teste de Campo Aberto. (A) tempo de *grooming* dos animais, $F = 0.7646$; $df = 62$; (B) Quantidade de pellets fecais observados durante os testes realizados com seis e dezesseis semanas P.I, $F = 0.4542$. $df = 64$. ANOVA.

4.4.5 Teste de Labirinto em Y

O teste de Labirinto em Y foi utilizado para avaliação da aversão ao odor do felino, por ser um teste de escolha simples entre duas regiões do aparato. Para tal, foi utilizada a urina de um gato adulto macho e um aminoácido presente na urina de gatos denominado L-felinina. Durante o teste foram contabilizados o número de entrada em cada braço, o tempo de permanência em cada braço e a latência de escolha da primeira entrada nos dois períodos de teste, com seis e dezesseis semanas pós-infecção. Na questão do tempo de permanência foi observada uma diferença estatística somente no tempo de permanência na área sem odor da L-felinina para o grupo controle seis semanas pós – infecção (Figura 33 C).

Figura 33 - Porcentagem de tempo de permanência nas diferentes regiões do aparato no teste de Labirinto em Y; (A) com seis semanas P.I utilizando urina de gato; (B) com dezesseis semanas P.I utilizando urina de gato; (C) com seis semanas P.I utilizando L-Felinina, $F = 5.75$; $df = 117$. ANOVA; (D) com dezesseis semanas P.I usando L-felinina.

Foi verificada a escolha inicial do primeiro braço optado pelo animal e não foi constatada alterações significativas entre os grupos, desta forma, optou-se por apresentar graficamente apenas o número de entradas totais dos animais durante o teste, que é apresentado a seguir.

Em relação ao número de entradas, em uma fase inicial de infecção, pode-se observar que os animais infectados pela cepa VEG entraram mais no braço contendo a urina de gato em comparação com os grupos controle e ME - 49 (Fig 34 A). Fenômeno semelhante ocorreu para L-felinina, mas em comparação com o grupo ME - 49 (Fig 34 C). Já após dezesseis semanas de infecção, observou-se que os animais do grupo controle entraram mais nos braços contendo o odor em comparação com os demais grupos (Fig 34 B e D). Esse fato pode estar relacionado à menor locomoção observada no grupo VEG devido ao aumento do

Figura 35 – Latência de entrada no primeiro braço escolhido no Labirinto em Y. (A) urina de gato, seis semanas P.I.; $F = 1.083$; $df = 39$; (B) urina de gato dezesseis semanas P.I.; $F = 1.370$; $df = 27$; (C) L-felinina, seis semanas P.I.; $F = 1.627$; $df = 41$ e (D) L-felinina, dezesseis semanas P.I.; $F = 2.159$; $df = 25$. ANOVA

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A manipulação comportamental é uma corrente teórica utilizada para explicar as alterações comportamentais presentes em hospedeiros intermediários parasitados pelo *T. gondii*. Vários estudos propõem que a infecção pelo *T. gondii* pode provocar mudanças metabólicas, imunológicas e neuropatológicas, possibilitando o desenvolvimento de alterações no comportamento dos hospedeiros intermediários, principalmente roedores^{38, 88}. Essas mudanças teriam como objetivo tornar o hospedeiro intermediário mais vulnerável à predação, possibilitando a veiculação do parasita imaturo presente nesse hospedeiro, para o felino (hospedeiro definitivo), no qual, ocorre a fase sexuada do ciclo de vida do parasita, resultando na formação e disseminação de novas formas parasitárias ao ambiente, o que garante a variabilidade genética da espécie^{10, 46, 47}.

Em grandes centros urbanos como a cidade de São Paulo, a infestação de roedores é uma grande preocupação à saúde, pois, além das doenças relacionadas a esses animais, a grande população de roedores também pode contribuir com a disseminação do *T. gondii*. Apesar do índice de infestação predial da espécie *Mus musculus*, espécie avaliada em nossa pesquisa, ser inferior à de outras espécies de roedores⁸⁹, uma avaliação do efeito da infecção crônica de *T. gondii* nesses animais pode inferir o cenário natural dos complexos fatores relacionados à manipulação parasitária em roedores. Assim, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na transmissão do parasita dos roedores para os felinos é de extrema importância, pois permitiria o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação parasitária, além de auxiliar na compreensão das características do ciclo de vida de outros parasitas que desencadeiam alterações comportamentais.

Para auxiliar nessa compreensão, nosso trabalho visou avaliar o efeito de diferentes cepas de *T. gondii* no comportamento de camundongos, observando,

também, aspectos sorológicos, clínicos e carga parasitária no SNC dos animais. Para avaliar os aspectos relacionados à memória, utilizamos o teste de Esquiva Inibitória. A memória pode ser classificada e avaliada em diversos aspectos, um deles, e de grande relevância é a abordagem temporal. A primeira etapa para a aquisição de memória se dá na chegada da informação captada por alguma estrutura sensorial e seu armazenamento no depósito sensorial (que registra essa informação por pouquíssimo tempo), no qual, esta pode ser descartada ou armazenada na etapa seguinte conforme sua relevância⁹⁰. O depósito sensorial, também pode ser denominado memória imediata⁹¹. A próxima etapa no processo de aquisição de memória consiste na memória de curto prazo, que em relação ao tempo pode apresentar subdivisões (memória de curto prazo – segundos a minutos e memória de prazo intermediário – minutos a horas). Para as informações sensoriais serem armazenadas nesse tipo de memória é necessário que ocorra um processo chamado reconhecimento de padrão, no qual padrões sensoriais são associados a um significado, ou seja, a informação captada e armazenada na memória imediata ganha um sentido. Após a informação entrar nesse tipo de categoria ela pode ser elevada a memória de longo prazo (que pode durar dias, semanas ou mais tempo), principalmente se a informação é ensaiada e repetida. Há duas categorias de informação armazenadas na memória de longo prazo, que consiste nas informações episódicas, as quais estão relacionadas a um lugar e/ou tempo específicos e as informações semânticas, que são associadas ao conhecimento relativo à linguagem^{90, 91}.

Como os testes comportamentais foram realizados em duas vezes (com seis e dezesseis semanas após a inoculação), serão inicialmente discutidas as primeiras etapas do teste. O teste de esquiva apresenta dois compartimentos, um iluminado e outro escuro e sabendo-se da tendência dos animais de se encaminharem ao compartimento escuro, foi, nesse local, que eles levaram o estímulo aversivo

(choque). A primeira fase do teste 1 consistiu no treinamento e nessa etapa os animais, ainda, não tinham tido acesso ao aparato, sendo observada diferença nas latências de entrada no compartimento escuro do aparelho, porém, esse fato não está associado com questões de aprendizagem ou memória, já que, nessa etapa, os animais que entraram no compartimento escuro tiveram contato pela primeira vez com o estímulo aversivo (fase inicial da aquisição de memória). Após noventa minutos do treinamento, os animais foram colocados novamente no aparato para uma nova mensuração e pode-se observar redução do número de animais que entraram no compartimento escuro e aumento da latência de entrada, sem diferenças entre os grupos. Nesta fase, foi avaliada a capacidade de reconhecimento de padrão dos animais, pois o estímulo aversivo (choque) deveria ser codificado, apresentando assim um significado aos animais (aprendizagem). Além disso, avaliou-se a memória intermediária (curto prazo), pois o ensaio foi realizado noventa minutos após o treinamento e constatou-se que não houve diferenças entre os grupos na capacidade de aprendizagem, indicando que todos os grupos tiveram a aptidão de correlacionar o estímulo aversivo com o compartimento escuro, demonstrando um reconhecimento de padrão sensorial adequado. A memória intermediária também se mostrou eficaz, uma vez que, os animais transferiram a informação do depósito sensorial (memória imediata) para a memória de curto prazo (intermediária) com eficácia.

O terceiro passo foi a aplicação do teste após vinte e quatro horas do treinamento, sendo consolidada e avaliada a memória de longa duração, pois como mencionado, anteriormente, a repetição é um dos fatores que fazem com que a informação seja alojada nesse tipo de memória, pois os animais já tinham passado por dois ensaios anteriores. Nessa etapa, assim como na anterior, pode-se constatar boa aderência da informação nesse compartimento de memória, uma vez que, o número de entradas foi inferior ao observado no teste memória (T-90m) e a

latência continuou maior para os animais que, eventualmente, entraram no compartimento escuro, sugerindo boa capacidade de aquisição de memória de longo prazo em todos os grupos avaliados. Contudo, ao se analisar a capacidade de recuperação de memória de longo prazo no teste realizado dois meses após o treinamento, pode-se perceber que os grupos infectados apresentaram habilidade alterada de recuperação de memória de longo prazo, já que, tanto os animais infectados com a cepa ME-49 como VEG apresentaram número significativamente maior de entradas no compartimento escuro. Além disso, o grupo VEG também demonstrou uma latência significativamente menor do que os demais grupos. Estes resultados indicam que os animais infectados com *T. gondii* apresentam déficits de recuperação de memória de longo prazo, sendo que esses déficits foram mais proeminentes para a cepa VEG, pois, além do maior número de entradas dos animais no compartimento escuro, a latência foi reduzida em comparação com os demais grupos.

Levando em consideração um estudo anterior que avaliou o comportamento de animais infectados com *T. gondii* no teste de Esquiva Inibitória, Wang *et al.*⁷⁷ observaram em camundongos NIH com 10 semanas de idade, infectados congenitamente com a cepa PRU (tipo II), que os filhotes provindos de mães infectadas na fase inicial ou intermediária da gestação (5 e 10 dias) apresentaram maior número de erros (treinamento-aprendizagem) e menor latência no teste de avaliação de memória, realizado após 24h de treinamento. Desta forma, o estudo demonstrou que proles de fêmeas infectadas nas fases iniciais e intermediárias da gestação apresentaram maiores alterações de aprendizagem e memória. Desta forma, o resultado obtido no presente estudo corrobora em alguns aspectos com os resultados obtidos por Wang e colaboradores, uma vez que, observou-se nos animais alterações na latência e no número de entradas no compartimento escuro. Entretanto, não obtivemos alterações na aprendizagem, sendo que o tipo de

alteração encontrado no quesito de memória foi relacionado com a capacidade de recuperação da informação em uma exposição posterior, e não na aquisição de memória.

Neste contexto, pesquisas vêm demonstrando que a infecção crônica por *T. gondii* interfere principalmente no sistema límbico devido a maior quantidade de cistos cerebrais e lesões, sendo a amígdala apontada como a principal estrutura afetada pela colonização parasitária^{53, 60, 70}, embora, outras composições cerebrais também apresentem grande localização de cistos, como por exemplo, o hipocampo⁹². Há indícios que o hipocampo esteja relacionado com os processos de recuperação de memória, já que, obtém um grupo de neurônios denominados *oriens lacunosum moleculare* (OLM) que realiza ligação entre as áreas mais superficiais e profundas do hipocampo. Quando ativados, esses neurônios impedem a chegada de novas informações sensoriais ao hipocampo e ativam os mecanismos químicos de recuperação da memória. Quando alguma informação sensorial conhecida (visão, audição ou olfato) chega ao cérebro, os demais elementos sensoriais são bloqueados e a circuitaria cerebral para evocação da memória é ativada, possibilitando a lembrança (recuperação da memória) da informação inicialmente reconhecida⁹³. Assim, torna-se relevante o estudo sobre a interferência do *T. gondii* em estruturas cerebrais relacionadas a área do hipocampo, entre outras, para maior conhecimento sobre a ação parasitária e sua importância no comportamento dos animais infectados por este parasita.

É interessante ressaltar que o fato dos animais terem falhas na recuperação de memória em termos práticos pode resultar em maior exposição a ambientes aversivos como foi o caso na esquia inibitória. No ambiente natural a falha na recuperação da memória pode resultar em maior exposição a risco, uma vez que o animal tem dificuldade de relacionar o ambiente ao qual está sendo exposto a uma experiência ruim, como risco predatório entre outros.

Outro teste de aprendizagem e memória realizado pelo presente estudo foi o Labirinto de Barnes, porém, com o intuito de avaliar a memória espacial dos animais. Os resultados obtidos demonstram que não houve diferenças entre o padrão observado no grupo controle e os demais grupos de animais infectados quanto à capacidade de aprendizagem e memória espacial. Esse resultado não foi o mesmo encontrado por Goodwin *et al.*⁵⁴ que ao realizarem o teste Barnes em camundongos CD-1, com infecção congênita pela cepa VEG, demonstraram que machos com oito semanas de idade apresentaram maior déficit de aprendizagem e memória, pois tiveram alterações na estratégia de busca da toca apresentando maior tempo de investigação de buracos errados e maior latência para achar a toca. Embora, os resultados obtidos no presente trabalho sejam discordantes deste estudo, ao analisarmos os nossos dados no teste de Esquiva Inibitória observamos déficits de recuperação de memória em nossos animais.

Ainda, no quesito memória, é questionável se a toxoplasmose seria ou não um fator de risco para a doença de Alzheimer⁹⁴. Entretanto, um trabalho realizado por Mohle *et al.*⁹⁵ com modelo experimental de β -amilóide demonstrou que houve proteção nos animais infectados pelo parasita, pois estes conseguiram reduzir as placas, promovendo maior fagocitose de A β 42 solúvel e aumento da degradação proteolítica muito por causa do recrutamento de células mononucleares para o SNC. Desta forma, um maior conhecimento sobre como a infecção pelo *T. gondii* pode auxiliar nesse aspecto pode ser muito relevante para o estudo de novos métodos de combate à doença de Alzheimer, sendo um aspecto positivo ao estudo do parasita e sua influência no SNC⁹⁵.

Já em relação à aversão ao odor de felinos, trabalhos anteriores utilizando diferentes aparatos como campo aberto, labirinto em Y, entre outros, indicaram que animais infectados por *T. gondii* demonstram redução à aversão natural ao odor de

felino^{53, 56, 57}. Todavia, essa alteração comportamental parece estar ligada a alguns aspectos como a carga parasitária, na qual, quantidades intermediárias parecem ter um efeito mais eficaz na redução da aversão em animais infectados do que doses maiores ou inferiores de parasitas inoculados no hospedeiro⁵¹. Outro fator é a dose de estímulo ambiental, ou seja, ao analisar o efeito de diferentes concentrações de urina de gato sobre o comportamento dos animais pode-se notar que quantidades intermediárias também apresentam maior implicação na manipulação do comportamento do animal infectado pelo *T. gondii*⁵⁵. Desta forma, tais dados apontam que a manipulação comportamental causada pela infecção por *T. gondii* pode estar limitada a fatores específicos como a carga parasitária e dose do estímulo ambiental. Esses fatores aparentemente agiriam como mecanismos para maximizar a alteração comportamental como forma de deixar o animal infectado mais vulnerável a predação, já que, doses inferiores de estímulo ambiental (odor do felino) não seriam eficazes para provocar a alteração comportamental do animal, talvez por não compensarem um gasto energético e alterações fisiológicas que causassem mudanças no comportamento, por possivelmente indicar que o felino já não esteja mais próximo o suficiente para garantir sucesso da predação do hospedeiro parasitado. Em contrapartida, estímulos ambientais elevados fariam com que o instinto natural do animal (aversão ao odor do felino) se sobressaísse à manipulação comportamental do parasita⁵⁵.

Os resultados apresentados no teste Labirinto em Y demonstram que os animais infectados pela cepa VEG entraram mais no braço contendo a urina de gato em uma fase mais inicial de infecção em comparação com os demais grupos. Além disso, os animais entraram mais no braço contendo L-Felinina do que o grupo ME-49. Interessante notar que esse padrão não se manteve em uma fase mais tardia (dezesseis semanas pós-infecção) por possível influência de uma adaptação aos odores utilizados e também a possível influência da deterioração locomotora

observada nos animais infectados pela cepa VEG. Entretanto, não se sabe o que possa ter influenciado os animais infectados pela cepa ME-49. Corroborando com o nosso resultado que demonstrou que as cepas apresentaram comportamentos diferenciados em relação ao odor do predador, Kannan *et al.*⁵² compararam camundongos BALB/c infectados com as cepas ME-49 e PRU, ambas do tipo II. Em uma fase inicial da infecção crônica, todos os animais infectados apresentaram uma atração ao odor felino, porém, em uma fase tardia, apenas os animais inoculados com a cepa PRU continuaram a apresentar esse perfil comportamental. Assim, os resultados obtidos pela presente pesquisa reforçam a hipótese de um efeito cepa-dependente em relação ao comportamento dos animais infectados, pois supostamente os animais infectados pela cepa VEG demonstraram atração mais específica ao odor do felino. Entretanto, a metodologia do Labirinto de Y, utilizada em nosso trabalho, é ainda, pouco difundida em estudos com animais infectados com *T. gondii*, principalmente para avaliação da exposição de odor de felino, carecendo de informações para comparação.

As causas para a redução da aversão nata ao odor de felino em animais infectados pelo *T. gondii*, ainda, não são conhecidas, porém, hipóteses têm sido desenvolvidas para tentar explicar tal fenômeno. Uma delas consiste em alterações de vias cerebrais que poderiam interferir na informação olfativa desencadeando uma reação de aversão para vias relacionadas à atração sexual. House *et al.*⁵⁷ avaliaram a resposta comportamental de animais infectados com *T. gondii* quando expostos ao odor de felino ou de fêmeas. Os pesquisadores notaram que regiões relacionadas à atração sexual eram ativadas nos animais infectados e expostos a urina de gato, indicando uma possível alteração no processamento da informação olfativa. Outra questão levantada foi se o odor de qualquer felino seria capaz de provocar mudanças em animais parasitados. Para tal, foram comparados os efeitos comportamentais em humanos, através de um teste de preferência olfativa entre

homens e mulheres parasitados e seus respectivos controles, os quais tiveram contato com a urina de gato doméstico, tigre, cão, hiena e cavalo. Os pesquisadores verificaram uma redução da aversão apenas para a urina do gato doméstico, sendo levantada a suposição de que algo que fosse diferencial entre as urinas dos dois felinos (tigre e gato), possivelmente seria a causa da alteração comportamental. Desta forma, os pesquisadores chegaram ao aminoácido felinina, que está presente apenas na subfamília Felinae, a qual os gatos domésticos fazem parte, e está relacionado ao odor de marcação desses animais, porém maiores estudos devem ser realizados para confirmar a influência dessa substância na percepção olfativa de indivíduos soropositivos ao *T. gondii*. Estudos utilizando quantidades conhecidas de L-felinina são importantes porque poderiam substituir a utilização de amostras de urina que nem sempre apresentam quantidade equivalentes do aminoácido, o que poderia ser um viés para estudos comparativos. Além disso, o conhecimento de outras proteínas presentes na urina de predadores é fundamental, já que receptores específicos no sistema olfativo, principalmente no órgão vomeronasal são capazes de perceber tais substâncias e ativar vias de sinalização que desencadeiam o medo nos animais. Nesse sentido, uma questão importante para ser avaliada é se esse aminoácido agiria como uma MUP (molécula estimulante do medo)⁵⁸.

Assim, a pesquisa dá indícios que a infecção pelo protozoário possa ter efeito na preferência olfativa em humanos, como observado em animais⁵⁸. Para humanos, acredita-se que a preferência por felinos pelas pessoas soropositivas seja um resquício evolutivo, uma vez que uma pesquisa realizada por Poirotte *et al.*⁹⁶ demonstraram que chimpanzés soropositivos para *T. gondii* tiveram uma redução da aversão ao odor de leopardo que é considerado um predador natural desses animais.

Essas são apenas algumas hipóteses para explicar o fenômeno da redução ao medo do odor do felino que é inato em algumas espécies de animais e que se acredita que seja o comportamento chave de manipulação comportamental do parasita, uma vez que os felinos são seus hospedeiros definitivos⁵². Entretanto, outras pesquisas são necessárias para melhor compreensão das estruturas, substâncias e mecanismos envolvidos na redução da aversão ao odor felino

Em relação ao teste de Labirinto em Cruz Elevado, Kannan *et al.*⁵² avaliaram a ansiedade de camundongos BALB/c infectados com cepas PRU e ME-49 ambas do tipo II e não constataram divergências na proporção de ocupação do braço aberto em relação ao período total do teste entre os animais infectados e o grupo controle. Os resultados apresentados no presente trabalho com o Labirinto em Cruz Elevado estão de acordo com este trabalho, uma vez que, não foram constatadas diferenças no período de ocupação entre a área aberta e fechada do labirinto entre os grupos controle, ME-49 e VEG. Contudo, outras pesquisas com animais infectados pelo parasita apresentaram resultados divergentes, sendo observada maior exploração no braço aberto, tanto em relação à movimentação⁵⁰, quanto tempo de permanência e número de entradas nessa região do labirinto⁵¹. Acredita-se que a maior exploração do braço aberto do labirinto esteja relacionada a um efeito ansiolítico^{97, 98}.

Alguns trabalhos procuraram avaliar aspectos fisiológicos relacionados à ansiedade e observaram alterações nos níveis de corticosterona e na plasticidade de BLA. Acredita-se que haja um feedback positivo entre os níveis de corticosterona e plasticidade em BLA. Assim, quanto maior a matriz dendrítica de BLA maior a quantidade de corticosterona secretada e consequentemente maior a ansiedade observada em modelo experimental. Uma pesquisa com animais infectados demonstrou uma retração dendrítica da BLA e menores níveis séricos de corticosterona em animais infectados, corroborando com inúmeras pesquisas que

observaram um efeito ansiolítico da infecção pelo *T. gondii*. Assim, o estudo da infecção parasitária poderia auxiliar no conhecimento dos mecanismos envolvidos, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle de transtornos de ansiedade⁷¹.

Na questão motora, avaliada pelo Labirinto em Cruz Elevado e pelo Campo Aberto, verificou-se que os animais infectados pela cepa VEG (tipo III) apresentaram alterações mais significativas do que o grupo ME-49. O grupo VEG apresentou menor número de entradas nas áreas do Labirinto em Cruz. Já no Campo Aberto, esses animais tiveram maior tempo de imobilidade, redução dos movimentos horizontais e verticais totais, principalmente na primeira avaliação após seis semanas de infecção. A redução da atividade motora em conjunto com outros fatores pode ser indício de comportamento doentio. O Comportamento doentio é um conjunto de alterações que geralmente acompanha o indivíduo infectado, mas não necessariamente é fruto de alterações fisiopatológicas da doença. Assim, sintomas como febre, redução da movimentação, letargia, redução de peso podem ser considerados comportamentos doentios⁴⁴. Existem pouquíssimas pesquisas que avaliam comportamento doentio em animais infectados pelo *T. gondii* e apenas um trabalho observou sinais de comportamento doentio caracterizados pela redução da locomoção e sinais de depressão detectados pelo teste de sacarose, no qual há uma redução da preferência dessa substância em animais com sintomas depressivos. Alguns pesquisadores acreditam que a produção de IFN- γ durante a infecção e ativação da IDO e interrupção da neurotransmissão serotoninérgica sejam fatores relacionados com o aparecimento desses sintomas comportamentais⁴⁵.

Na presente pesquisa além da redução da atividade motora, também se observou certa estagnação do peso corporal nos animais infectados principalmente

no grupo VEG e uma certa tendência de redução de *grooming* no teste de campo aberto, embora não seja estatisticamente diferente entre os grupos.

É interessante notar, que apesar do grupo VEG apresentar indícios de comportamento doentio ele foi o único grupo a ter certa atração ao odor felino, levantando a hipótese de que na natureza animais que apresentem comportamento doentio decorrente da infecção pelo *T. gondii* possam ter seu comportamento manipulado.

Embora, algumas pesquisas demonstrem aumento da atividade locomotora e exploratória em animais infectados^{7, 50}, é muito interessante notar que animais que apresentem diminuição desses parâmetros também podem apresentar uma redução ao medo do felino, levantando a hipótese que existam inúmeras apresentações comportamentais possíveis e que mesmo de maneiras diferenciadas possam resultar em maior risco predatório dos animais infectados.

Os resultados indicam que a cepa VEG desenvolveu alterações comportamentais mais evidentes em comparação com os demais grupos. Ao se comparar a detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii* pelo método ELISA no soro dos grupos infectados, pode-se observar que o grupo VEG apresentou título mais elevado em relação ao grupo ME-49. Esse dado indica que a infecção crônica pela cepa do tipo III (VEG), possivelmente, induziu uma maior resposta imune humoral dos animais, do que a infecção pela cepa do tipo II (ME-49). Isto pode ter resultado em um efeito diferenciado nos níveis de neurotransmissores entre as infecções causadas pela cepa VEG e ME-49. Acredita-se que certos componentes do sistema imune possam interferir quimicamente no metabolismo cerebral, alterando, por exemplo, níveis de neurotransmissores que poderiam influenciar o comportamento dos animais infectados¹¹.

Além disso, a quantificação de parasitas cerebrais por PCR em tempo real mostrou que os animais infectados pela cepa VEG apresentaram maior número de

parasitas no SNC em relação aos animais infectados pela cepa ME 49, sendo este efeito mais proeminente após quatro meses de infecção. Isto explicaria o fato de apenas os animais infectados por esta cepa terem apresentado alterações motoras decorrentes do efeito provocado pela inflamação causada pela maior quantidade de cistos. Ingram *et al.*⁶³ também observaram um aumento da carga parasitária no SNC de animais infectados por cepa do tipo III semelhante ao nosso modelo de infecção da cepa VEG. É interessante observar que maior número de parasitas no SNC pode resultar em maior migração de fatores imunes ao SNC e maior número de lesões, podendo ser um importante fator, embora não único para o desenvolvimento de alterações comportamentais.

O presente trabalho ajuda a reforçar aspectos observados por Ingram *et al.*⁶³ e Kannan *et al.*⁵² em relação às alterações comportamentais induzidas por diferentes cepas de *T. gondii*. Além dos aspectos comportamentais as diferentes cepas de *T. gondii* podem ocasionar alterações fisiológicas distintas no hospedeiro. Animais infectados pela cepa VEG apresentam maior infiltrado inflamatório e maior número de cistos cerebrais em fase inicial de infecção do que animais infectados pela cepa ME-49 que só vão apresentar características semelhantes em fase mais tardia da infecção, porém ambas as cepas apresentam níveis elevados de NO, TBARs e GR que são marcadores de estresse oxidativo em comparação com animais não infectados pelo *T. gondii*⁶⁸.

Outro aspecto relevante que o presente trabalho ressalta é a necessidade de novas pesquisas e a ampliação de estudos que viabilizem a compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais observadas durante a infecção pelo *T. gondii*, principalmente, na questão do possível efeito cepa-específico. A ampliação do conhecimento nessa área pode auxiliar na compreensão de dados epidemiológicos da doença, pois uma possível relação entre dominância de casos clínicos por determinada cepa e seu perfil de mudança comportamental,

poderia indicar que para uma região, e até mesmo para grupos específicos de hospedeiros intermediários (silvestres ou não), essa cepa seria mais eficiente, permitindo a perpetuação do ciclo de vida do *T. gondii*. Outro aspecto que o estudo mais detalhado das alterações comportamentais possibilitaria, seria melhor compreensão dos perfis evolutivos das diferentes linhagens genéticas do parasita, pois uma hipótese interessante seria a probabilidade de cepas mais competentes no processo de manipulação comportamental de seus hospedeiros intermediários terem se sobressaído evolutivamente sobre outras cepas. Assim, essa abordagem auxiliaria na reconstrução e conhecimento da história natural da infecção pelo *T. gondii*.

Outro enfoque importante é que, possivelmente, a infecção pelo *T. gondii* possa ter influência para o desenvolvimento de algumas doenças psiquiátricas que acabam gerando grande custo ao governo pelas intervenções terapêuticas necessárias ou pela incapacidade observada em seus portadores. Uma metanálise recente demonstra odds ratio positivo de relação entre soropositividade para *T. gondii* e transtorno bipolar, esquizofrenia e possivelmente para o TOC e abuso de drogas, entretanto maiores pesquisas são necessárias para compreender melhor os mecanismos fisiológicos envolvidos. Na esquizofrenia acredita-se que o possível aumento da liberação da dopamina observada em células parasitadas possa ser um fator importante no desenvolvimento da doença⁹⁹. Também merece destaque o papel de alterações no sistema imune em transtornos psiquiátricos como o transtorno bipolar^{99, 100}, já que animais infectados geralmente apresentam um infiltrado inflamatório no SNC. A infecção pela cepa VEG apresenta maior infiltrado inflamatório em comparação com a cepa ME-49⁶⁸, além de um aumento no número de parasitas no SNC ao longo do tempo⁶³, sendo este último fato também observado em nossa pesquisa. Além disso, tem-se analisado correlações positivas

entre soropositividade ao *T. gondii* e maior número de acidentes de trânsito^{101, 102}, esquizofrenia¹⁰⁰.

Os fascínios da relação parasita-hospedeiro vão muito além do desenvolvimento de estratégias do parasita para usufruir de seu hospedeiro e dos mecanismos imunológicos de combate à infecção. A possível influência comportamental observada em algumas relações parasitárias, ainda, apresenta muitas questões em aberto, tornando-se um vasto campo de estudos interdisciplinares, incluindo conhecimentos de diversas áreas como neurociência, etologia, imunologia, genética e parasitologia, amparados na compreensão da complexa relação entre os organismos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

6.1 Gerais

Nossos dados sugerem que a infecção crônica por cepas cistogênicas geneticamente distintas de *T.gondii* alteram o comportamento de camundongos BALB/c, sendo este efeito mais proeminente na infecção pela cepa VEG (tipo III).

6.2 Específicas

a) Foi possível desenvolver modelos de infecção experimental em camundongos BALB/c com as cepas ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) de *T.gondii* com acompanhamento da evolução das infecções por um período experimental de quatro meses;

b) A resposta imune humoral contra antígenos proteicos de *T.gondii* foi mais acentuada nos animais infectados pela cepa VEG (tipo III). O ensaio de ELISA com peptídeos sintéticos mostrou perfil de resposta imune humoral específico para cada cepa infectante;

c) A quantificação de parasitas cerebrais por PCR em tempo real mostrou que os animais infectados pela cepa VEG apresentaram maior número de parasitas no cérebro em relação aos animais infectados pela cepa ME 49, sendo este efeito mais proeminente após quatro meses de infecção;

d) As infecções causadas pelas cepas ME49 e VEG não ocasionaram redução no peso corporal dos animais durante o período experimental;

e) O Teste de Esquiva Inibitória mostrou que as infecções por ambas as cepas levaram à redução da capacidade de recuperação de memória de longo prazo, sendo que este efeito foi mais evidente na infecção pela cepa VEG;

f) O Teste de Labirinto de Barnes mostrou que a memória espacial e a aprendizagem dos animais não foram alteradas pelas infecções por ambas as cepas;

g) O Teste de Labirinto em Y demonstrou que os animais infectados pela cepa VEG tiveram discreta atração ao odor do felino, entrando mais nos braços contendo urina de gato e L-Felinina;

h) O Teste de Labirinto em Cruz Elevado mostrou que não houve efeito da infecção pelas diferentes cepas na ansiedade dos animais;

i) O Teste de Campo Aberto mostrou que somente a infecção pela cepa VEG foi capaz de alterar a atividade motora e exploratória dos animais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.
- 2- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009 Jul 1;39(8):895-901
- 3- Souza W, Martins – Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. Scientia Medica. 2010. 20; 1 : 131-43.
- 4- Hill, DE., and Dubey, JP., 2014, Toxoplasmosis: Reston, Va., U.S. Geological Survey Circular 1389, 2014, 84 p., 1.
- 5- Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward GE. Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 6;93(16):8413-8.
- 6- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998 Apr;11(2):267-99.
- 7- Hodkova H, Kodym P, Flegr J. Poorer results of mice with latent toxoplasmosis in learning tests: impaired learning processes or the novelty discrimination mechanism? Parasitology. 2007 Sep;134(Pt 10):1329-37.
- 8- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Protozoários do Sangue e dos Tecidos. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, p. 677-679.
- 9- Centers for Disease Control and Prevention. *Toxoplasmosis: life cycle*. Atlanta: CDC; 2010. [cited 2017 Oct 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>.
- 10- Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. Schizophr Bull. 2007 May;33(3):752-6.
- 11- Webster JP, McConkey GA. *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. Folia Parasitol (Praha). 2010 Jun;57(2):95-104.

- 12- ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. 2012. [citado 2015 Jan 25]. Disponível em: <http://abinpet.org.br/imprensa/mercado-pet-deve-faturar-r-154-bilhoes-em-2013/>.
- 13- Meireles LR, Galisteo AJ Jr, Pompeu E, Andrade HF Jr. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. Trop Med Int Health. 2004 Aug;9(8):876-81.
- 14- Pena HF, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res Vet Sci. 2006 Aug;81(1):58-67.
- 15- Cardia DF, Camossi LG, Neto Lda S, Langoni H, Bresciani KD. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and Leishmania spp. infection in cats from Brazil. Vet Parasitol. 2013 Nov 8;197(3-4):634-7.
- 16- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: correlation of Parasite Genotype with Human Disease. J Infect Dis. 1995 Dec; 172 (6): 1561-1566.
- 17- Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. Parasite. 2008 Sep;15(3):366-71.
- 18- Su CkA, Zhou PMD, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 10;109(15):5844-9.
- 19- Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. Parasitology. 2014 Apr;141(4):453-61.
- 20- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science. 2001 Oct 5;294(5540):161-5.
- 21- Dardé ML, Ajzenberg D, Su C. Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*. In: L.M Weiss and K. Kim. *Toxoplasma Gondii*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2014.-p.61-67, 2014.

- 22- Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol.* 2002 Aug;5(4):438-42.
- 23- Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* 2008 Jul;24(7):299-303.
- 24- Saraf P, Shwab EK, Dubey JP, Su C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp Parasitol.* 2017 Mar;174:25-30.
- 25- Dubey JP, Frenkel JK. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol.* 1973 Jun;59(3):505-12
- 26- Suzuki Y, Yang Q, Remington JS. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1995 Dec;81(6):1032-4.
- 27- Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, *et al.* Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis.* 2007 Oct 1;45(7):e88-95.
- 28- Remington JS, McLeod R, Wilson CB, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 918-1041.
- 29- Moon JH, Pyo KH, Jung BK, Chun HS, Chai JY, Shin EH. Resistance to *Toxoplasma gondii* infection in mice treated with silk protein by enhanced immune responses. *Korean J Parasitol.* 2011 Sep;49(3):303-8.
- 30- Dubey J. P. *Toxoplasmosis of animals and man.* CRC Press, Florida: Boca Raton; 2010.
- 31- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis.* 2012 Nov;44(11):805-14.
- 32- Buxton D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol Today.* 1993 Sep;9(9):335-7.

- 33- Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. Clin Exp Ophthalmol. 2013 Jan-Feb;41(1):95-108.
- 34- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1217-58. Review. Erratum in: Int J Parasitol 2001 Feb;31(2):217-20.
- 35- Hampton MM. Congenital Toxoplasmosis: A Review. Neonatal Netw. 2015;34(5):274-8.
- 36- Falangola MF, Petito CK. Choroid plexus infection in cerebral toxoplasmosis in AIDS patients. Neurology. 1993 Oct;43(10):2035-40.
- 37- Santo AH, Pinheiro CE, Jordani MS. Aids as underlying and associated causes of death, State of S. Paulo, Brazil, 1998. Rev Saude Publica. 2000 Dec;34(6):581-8.
- 38- Vyas A, Sapolsky R. Manipulation of host behaviour by *Toxoplasma gondii*: what is the minimum a proposed proximate mechanism should explain? Folia Parasitol(Praha). 2010 Jun;57(2):88-94.
- 39- Chieffi PP. Parasitoses e alterações comportamentais. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 2015;60:76-84.
- 40- Flegr J, Lenochová P, Hodný Z, Vondrová M. Fatal attraction phenomenon in humans: cat odour attractiveness increased for toxoplasma-infected men while decreased for infected women. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Nov;5(11):e1389.
- 41- Kanková S, Kodym P, Frynta D, Vavrinová R, Kubena A, Flegr J. Influence of latent toxoplasmosis on the secondary sex ratio in mice. Parasitology. 2007 Nov;134(Pt 12):1709-17.
- 42- Worth AR, Lymbery AJ, Thompson RC. Adaptive host manipulation by *Toxoplasma gondii*: fact or fiction? Trends Parasitol. 2013 Apr;29(4):150-5.
- 43- Worth AR, Andrew Thompson RC, Lymbery AJ. Reevaluating the evidence for *Toxoplasma gondii*-induced behavioural changes in rodents. Adv Parasitol. 2014;85:109-42.

- 44- Alves GJ, Palermo-Neto J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. *Rev Bras Psiquiatr.* 2007 Dec;29(4):363-9.
- 45- Mahmoud ME, Ihara F, Fereig RM, Nishimura M, Nishikawa Y. Induction of depression-related behaviors by reactivation of chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Behav Brain Res.* 2016 Feb 1;298(Pt B):125-33.
- 46- Guinello M, Acquarone M, Kim JH, Spray DC, Barbosa HS, Sellers R, *et al.* Acquired infection with *Toxoplasma gondii* in adult mice results in sensorimotor deficits but normal cognitive behavior despite widespread brain pathology. *Microbes Infect.* 2010 Jul; 12(7):528-37.
- 47- Yolken RH, Torrey EF. Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence. *Mol Psychiatry.* 2008 May;13(5):470-9.
- 48- Day JF, Edman JD. Malaria renders mice susceptible to mosquito feeding when gametocytes are most infective. *J Parasitol.* 1983 Feb;69(1):163-70.
- 49- De Moraes CM, Stanczyk NM, Betz HS, Pulido H, Sim DG, Read AF, Mescher MC. Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 29;111(30):11079-84.
- 50- Afonso C, Paixão VB, Costa RM. Chronic *Toxoplasma* infection modifies the structure and the risk of host behavior. *PLoS One.* 2012;7(3):1-15.
- 51- Gonzalez LE, Rojnik B, Urrea F, Urdaneta H, Petrosino P, Colasante C, *et al.* *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats A behavioral analysis. *Behav Brain Res.* 2007 Feb 12;177(1):70-9.
- 52- Kannan G, Moldovan K, Xiao JC, Yolken RH, Jones-Brando L, Pletnikov MV. *Toxoplasma gondii* strain-dependent effects on mouse behaviour. *Folia Parasitol (Praha).* 2010 Jun;57(2):151-5.
- 53- Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 10;104(15):6442-7. A
- 54- Goodwin D, Hrubec TC, Klein BG, Strobl JS, Werre SR, Han Q, *et al.* Congenital infection of mice with *Toxoplasma gondii* induces minimal change in behavior and no change in neurotransmitter concentrations. *J Parasitol.* 2012 Aug;98(4):706-12.

- 55- Vyas A, Kim SK, Sapolsky RM. The effects of toxoplasma infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neuroscience*. 2007 Aug 24;148(2):342-8. B
- 56- Lamberton PH, Donnelly CA, Webster JP. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. *Parasitology*. 2008 Sep;135(10):1143-50.
- 57- House PK, Vyas A, Sapolsky R. Predator cat odors activate sexual arousal pathways in brains of *Toxoplasma gondii* infected rats. *PLoS One*. 2011;6(8):e23277.
- 58- Papes F, Logan D W, Stowers L. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell*, 2010; 141(4): 692-703.
- 59- Hendriks WH, Moughan PJ, Tarttelin MF, Woolhouse AD. Feline: a urinary amino acid of Felidae. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1995 Dec;112(4):581-8.
- 60- Haroon F, Händel U, Angenstein F, Goldschmidt J, Kreutzmann P, Lison H, Fischer KD, Scheich H, Wetzel W, Schlüter D, Budinger E. *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. *PLoS One*. 2012;7(4):e35516.
- 61- Xiao J, Kannan G, Jones-Brando L, Brannock C, Krasnova IN, Cadet JL, Pletnikov M, Yolken RH. Sex-specific changes in gene expression and behavior induced by chronic *Toxoplasma* infection in mice. *Neuroscience*. 2012 Mar 29;206:39-48.
- 62- Parlog A, Schlüter D, Dunay IR. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol*. 2015 Mar;37(3):159-70.
- 63- Ingram WM, Goodrich LM, Robey EA, Eisen MB. Mice infected with low-virulence strains of *Toxoplasma gondii* lose their innate aversion to cat urine, even after extensive parasite clearance. *PLoS One*. 2013 Sep 18;8(9):e75246.
- 64- Prandovszky E, Gaskell E, Martin H, Dubey JP, Webster JP, McConkey GA. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PLoS One*. 2011;6(9):e23866.

- 65- Koshy AA, Dietrich HK, Christian DA, Melehan JH, Shastri AJ, Hunter CA, *et al.* Toxoplasma co-opts host cells it does not invade. PLoS Pathog. 2012;8(7):e1002825.
- 66- Goebel S, Gross U, Lüder CG. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression. J Cell Sci. 2001 Oct;114(Pt 19):3495-505.
- 67- Graumann K, Hippe D, Gross U, Lüder CG. Mammalian apoptotic signaling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death. Microbes Infect. 2009 Nov;11(13):1079-87.
- 68- Tonin AA, Da Silva AS, Thomé GR, Sangoi MB, Oliveira LS, Flores MM, *et al.* Influence of toxoplasmosis on acetylcholinesterase activity, nitric oxide levels and cellular lesion on the brain of mice. Pathol Res Pract. 2014 Aug;210(8):526-32.
- 69- Flegr J. Effects of toxoplasma on human behavior. Schizophr Bull. 2007 May;33(3):757-60.
- 70- Koçak OM, Atmaca HT, Terzi OS, Ozdemir H, Uzunalioglu T, Kul O, *et al.* Experimental Chronic Toxoplasmosis model in mice: brain lesions and related behavioral changes. Arch Neuropsychiatry, 2012(49): 139-144.
- 71- Mitra R, Sapolsky RM, Vyas A. *Toxoplasma gondii* infection induces dendritic retraction in basolateral amygdala accompanied by reduced corticosterone secretion. Dis Model Mech. 2013 Mar;6(2):516-20.
- 72- Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. J Neuroendocrinol. 2009 Mar; 21(4):410-4.
- 73- Subauste C. Animal models for *Toxoplasma gondii* infection. Curr Protoc Immunol. 2012 Feb;Chapter 19:Unit 19.3.1-23.
- 74- Berté. TE. Estudo da atividade Anticolinesterásica dos compostos Taraxerol e Ácido Ursólico: implicações sobre o processo de Memória [dissertação]. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí; 2009. Available from: http://siaibib01.univali.br/biblioteca/php/pbasbi2.php?codAcervo=186227&codBib=0&codMat=,&flag=&desc=&titulo=Aquisi%E7%F5es&contador=0&tipo=bd&letra=td&cod=&texto=&posicao_atual=1733&posicao_maxima=1733.

- 75- Albuquerque FS, Silva RH. Amygdala and the slight boundary between memory and emotion Rev. psiquiatr. 2009 Apr;31(3): 1-18.
- 76- Wang YZ, Chen J, Chu SF, Wang YS, Wang XY, Chen NH, *et al.* Improvement of memory in mice and increase of hippocampal excitability in rats by ginsenoside Rg1's metabolites ginsenoside Rh1 and rotopanaxatriol. J Pharmacol Sci. 2009 Apr;109(4):504-10.
- 77- Wang T, Liu M, Gao XJ, Zhao ZJ, Chen XG, Lun ZR. *Toxoplasma gondii*: the effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. Exp Parasitol. 2011 Jan;127(1):107-12.
- 78- Sunyer B, Patil S, Höger H, Lubec G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice Nature protocols 390. 2007. [cited 2015 Feb 02]. Available from: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/349>.
- 79- Guizzo R. Transtornos de ansiedade: o que são e como podem ser estudados em animais de laboratório. INeC— Instituto de Neurociências e Comportamento, 2009. [citado Mai 10]. Available from: <http://www.inec-usp.org/cursos/cursosIII/cursosIII.htm>
- 80- Crawley JN, Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. Horm Behav. 1997 Jun; 31(3):197- 211.
- 81- Kavaliers M, Wiebe JP, Galea LA. Reduction of predator odor-induced anxiety in mice by the neurosteroid 3 alpha-hydroxy-4-pregnen-20-one (3 alpha HP). Brain Res. 1994 May 9;645(1-2):325-9.
- 82- Voznessenskaya VV. Influence of Cat Odor on Reproductive Behavior and Physiology in the House Mouse: (Mus Musculus). In: Mucignat-Caretta C, editor. Neurobiology of Chemical Communication. CRC Press, Florida: Boca Raton; 2014. Chapter 14.
- 83- Bramley GN, Waas JR. Laboratory and field evaluation of predator odors as repellents for kiore (*Rattus exulans*) and ship rats (*R. rattus*). J Chem Ecol. 2001 May;27(5):1029-47.
- 84- Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. J Infect Dis. 2003;187(9):1484-95.

- 85- Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Dardé ML. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. Clin Vaccine Immunol. 2008 Sep;15(9):1380-6.
- 86- Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, da Costa JC, Dardé ML. Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. Clin Vaccine Immunol. 2009 Aug;16(8):1158-69.
- 87- Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Dardé ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meatproducing animals. Vet Parasitol. 2010 Apr 19;169(1-2):24-8.
- 88- Silva RC, Langoni H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. Parasitol Res. 2009 Oct;105(4):893-8.
- 89- Masi, E. Roedores na cidade de São Paulo: Levantamento da Taxa de Infestação Predial e sua Relação com os Fatores Socioeconômicos e Ambientais. [dissertação]. São Paulo; Instituto Biológico – USP; 2008. Disponível em: http://www.biológico.sp.gov.br/pos_graduacao/pdf/masi.pdf.
- 90- Gerard RW. Memory: a glimpse into the past, an understanding of the present, and a key to the future. 1953. [cited 2014 Jun 15]. Available from: <http://penta.ufrgs.br/edu/telelab/1/memory2.htm>.
- 91- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. Temporal Categories of Memory. In: Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10948/>.
- 92- Berenreiterová M, Flegr J, Kuběna AA, Němec P. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. PLoS One. 2011;6(12):e28925.
- 93- Leão RN, Mikulovic S, Leão KE, Munguba H, Gezelius H, Enjin A, Patra K, Eriksson A, Loew LM, Tort AB, Kullander K. OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. Nat Neurosci. 2012Nov;15(11):1524-30.
- 94- Mahami-Oskouei M, Hamidi F, Talebi M, Farhoudi M, Taheraghdam AA, Kazemi T, Sadeghi-Bazargani H, Fallah E. Toxoplasmosis and Alzheimer: can

Toxoplasma gondii really be introduced as a risk factor in etiology of Alzheimer? Parasitol Res. 2016 ug;115(8):3169-74.

- 95- Möhle L, Israel N, Paarmann K, Krohn M, Pietkiewicz S, Müller A, *et al.* Chronic *Toxoplasma gondii* infection enhances β -amyloid phagocytosis and clearance by recruited monocytes. Acta Neuropathol Commun. 2016 Mar 16;4:25.
- 96- Poirotte C, Kappeler PM, Ngoubangoye B, Bourgeois S, Moussodji M, Charpentier MJ. Morbid attraction to leopard urine in Toxoplasma-infected chimpanzees. Curr Biol. 2016 Feb 8;26(3):R98-9.
- 97- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods. 1985 Aug;14(3):149-67
- 98- Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmacol Ther. 1990;46(3):321-40.
- 99- Sutterland AL, Fond G, Kuin A, Koeter MW, Lutter R, van Gool T, *et al.* Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. Acta Psychiatr Scand. 2015 Sep;132(3):161-79.
- 100- Zhu S. Psychosis may be associated with toxoplasmosis. Med Hypotheses. 2009 Nov;73(5):799-801.
- 101- Yereli K, Balcioğlu IC, Ozbilgin A. Is *Toxoplasma gondii* a potential risk for traffic accidents in Turkey? Forensic Sci Int. 2006 Nov 10;163(1-2):34-7.
- 102- Kocazeybek B, Oner YA, Turksoy R, Babur C, Cakan H, Sahip N, *et al.* Higher prevalence of toxoplasmosis in victims of traffic accidents suggest increased risk of traffic accident in Toxoplasma-infected inhabitants of Istanbul and its suburbs. Forensic Sci Int. 2009 May 30;187(1-3):103-8.

APÊNDICE A - Esquema de marcação dos animais

SISTEMA DE MARCAÇÃO

Animais: Camundongos BALB/c - machos.

P - Patas

ANEXO A - Carta de aprovação do projeto pela CPE/CEUA - IMT

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7193 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132
e 3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 02 de maio de 2013.

Ilmo (a)

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

(aos cuidados de Elizama Carneiro Machado Bezerra)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2013/166** e intitulado "Avaliação comportamental de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge S.R. Casseb
Professor Doutor do IMT
LIM 56 - FMUSP

Dr. Jorge Casseb

Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

ANEXO B - Carta de aprovação da CEUA – adendo de retirada de mais animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 16 de julho de 2014

Ilmo(a)

Dr(a). Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
(aos cuidados de Elizama Carneiro Machado Bezerra)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o **adendo, referente à inclusão de 45 camundongos da linhagem Balb/c**, no projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/166 Avaliação comportamental de camundongos Balb/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii***, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP