

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Elizama Carneiro Machado Bezerra

Caracterização comportamental e alterações fisiológicas de
camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas
geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Aversão original, encontra-se disponível na Biblioteca da FMUSP.

São Paulo
2023

ELIZAMA CARNEIRO MACHADO BEZERRA

Caracterização comportamental e alterações fisiológicas de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Aversão original, encontra-se disponível na Biblioteca da FMUSP.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Elizama Carneiro Machado

Caracterização comportamental e alterações fisiológicas de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* / Elizama Carneiro Machado Bezerra. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientadora: Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman.

Descritores: 1.Toxoplasma gondii 2.Controle comportamental 3.Infecção experimental animal 4.Comportamento animal 5.Metabolismo da glicose 6.PET ¹⁸F-FDG

USP/FM/DBD-255/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Bezerra. ECM. Caracterização comportamental e alterações fisiológicas de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Irineu Machado Bezerra e Maria Lucia Carneiro Machado Bezerra, vocês fazem parte desta conquista.

As minhas irmãs Léa Carneiro Machado Bezerra e Raquel Carneiro Machado Higa, meu cunhado Silas Satoshi Higa, minha sobrinha Agnes Yumi e meu sobrinho Samuel Yudi por estarem sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins.

Aos amigos que fiz durante a caminhada e a todos os colegas de trabalho.

Em especial a Angélica Moura Inacio Freixeira da Silva (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a minha orientadora, Professora Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman por todo apoio e dedicação empregados para o desenvolvimento da presente tese, sem sua ajuda em todos os âmbitos (financeiro, moral e trabalho) não teríamos alcançado o êxito. Além disso, fico muito feliz pela relação de companheirismo e amizade desenvolvida durante estes anos. Espero me tornar uma profissional semelhante a você, comprometida, ética e amorosa e levar seu conhecimento e disposição para os futuros alunos.

Não poderia deixar de agradecer ao Professor Dr. Sérgio Vieira dos Santos e ao Professor Dr. Pedro Paulo Chieff por abrirem as portas de seu laboratório na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, para a realização de testes comportamentais e manutenção dos animais. Agradeço à atenção, dedicação, energia e ensinamentos que vocês e sua equipe dispensaram de forma extremamente generosa para meu desenvolvimento. Espero que nossa parceria dure muitos anos.

Agradeço a Dra. Daniele de Paula Faria, Dra. Caroline Cristiano Real Gregório e Dra. Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta por realizarem os exames de imagem no Laboratório de Medicina Nuclear, Lim 43, pelos ensinamentos, paciência e profissionalismo dispensados para o desenvolvimento deste trabalho.

Outra pessoa muito importante para a realização deste trabalho e pelo meu desenvolvimento acadêmico é o Professor Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. Além disso, devo enaltecer sua generosidade, que sempre será muito significativa para mim, irei levar para vida seu exemplo de dedicação e incentivo à Ciência e, principalmente, sua paixão ao trabalho.

Agradeço a paciência e auxílio prestados pela secretária da pós-graduação Gislaine Matheus durante esse período.

As doutoras Camila Moreto e Vilma Pereira da Costa, médicas veterinárias que gentilmente cederam as amostras de urina de gato, deixo meu agradecimento.

O que dizer do Cayuan Tadeu Brandão Pinto que me acompanhou durante esses anos, permitindo que nossa amizade se fortificasse e fosse um ponto de apoio, nos momentos mais difíceis. Também gostaria de agradecer aos amigos especiais Talita

Caroline Coelho, Cynara Marques, Michel Rodrigues, Marina Cunha, Henrique Toyoda e Janaína Paulino por acompanharem a minha jornada.

Não poderia esquecer do Gabriel Castanheira e Flávia Freitas pelos almoços extremamente divertidos, além de nossos passeios, que incluíram amigos como o Thiago entre outros.

Também agradeço a minha companheira de disciplina e PAE, Gisele Sartori, pela cumplicidade e conversas edificantes.

Aos demais colegas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Andrés Gimenez, Luciano Monteiro, Ana Cristina Gomes, Camila Carvalho, Sandra Regina, Nahara Zorgi, Bárbara Fialho, Paulo Kawaikami, Lícia Natal, Ana Maria Duarte, Norival Kesper Jr, Marilda Nascimento, Izilda, Mônica e Gabriel) e do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (Daniel Maurício dos Santos e Érico Silva Tiago), além da equipe do Biotério da Santa Casa de São Paulo, representados pela Dra. Bruna Miagawa deixo meus sinceros agradecimentos por toda a cooperação, direta ou indiretamente, prestadas durante a realização da presente pesquisa. O convívio com pessoas tão especiais certamente proporcionou grande aprendizado e amadurecimento pessoal.

Registro aqui a importância que Angélica Moura Inácio Freixeira da Silva (*in memoriam*), teve para o laboratório de Protozoologia, sendo uma ótima companheira nesses anos de convívio, com certeza nos lembraremos de sua alegria contagiante, sua força de vontade e de viver.

Agradeço a CAPES pelo financiamento de minha bolsa de doutorado.

Por fim, o mais importante, agradeço a Deus por mais essa etapa concluída e a minha família por acreditarem e lutarem comigo. Amo vocês.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

Bezerra ECM. Caracterização comportamental e alterações fisiológicas de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A manipulação comportamental é a principal teoria utilizada pela neurociência para elucidar as alterações comportamentais de roedores infectados pelo *Toxoplasma gondii*. Estudos sugerem que a infecção pelo protozoário provoca mudanças metabólicas, imunológicas e neurológicas que possibilitam o desenvolvimento de alterações no fenótipo do hospedeiro parasitado, tornando-o mais exposto à predação, porém esses estudos utilizam cepas arquetípicas, ou geneticamente modificadas do parasita, sem descrições do efeito comportamental de cepas não arquetípicas, que são altamente prevalentes na América do Sul, sobretudo, no Brasil. Em nosso estudo, comparamos o efeito comportamental e neurofisiológico de infecções crônicas por cepas arquetípicas (ME49 e VEG) e não arquetípicas (#175 e #318) em camundongos Balb/c, que foram avaliados em dois períodos distintos da infecção por meio de diferentes parâmetros, como peso corporal; resposta imune humoral por ELISA; carga parasitária cerebral por qPCR; aprendizagem e memória pelo teste de Esquiva Inibitória; locomoção pelo teste de Campo Aberto; preferência olfativa (medo inato) pelo teste de Labirinto em Y e metabolismo da glicose cerebral pelo exame de imagem PET ¹⁸F-FDG em três regiões cerebrais (Forebrain, Midbrain e Hindbrain). Nossos dados demonstraram que a infecção pela cepa arquetípica VEG induziu maior resposta imune humoral e maior carga parasitária cerebral. Com relação aos parâmetros comportamentais, não observamos alterações cognitivas entre os grupos, porém os grupos infectados pelas cepas VEG e #175 apresentaram déficits de locomoção. Com relação à preferência olfativa pelo odor do predador que é o evento crucial da manipulação comportamental, observamos que somente os animais infectados pelas cepas não arquetípicas #175 e #318 apresentaram atração ao odor do felino. O exame de imagem PET ¹⁸F-FDG não apresentou diferenças significativas entre os grupos para as três áreas cerebrais avaliadas. Nossos dados foram inéditos e demonstraram um efeito cepa - dependente nas alterações comportamentais de roedores infectados por cepas geneticamente distintas de *T.gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Controle comportamental. Infecção experimental animal. Comportamento animal. Metabolismo da glicose. PET ¹⁸F-FDG.

ABSTRACT

Bezerra ECM. Behavioral characterization and physiological changes of BALB / c mice (*Mus musculus*) infected with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Behavioral manipulation is the main theory used by neuroscience to elucidate behavioral changes in rodents infected with *Toxoplasma gondii*. Studies suggest that infection by the protozoan causes metabolic, immunological and neurological changes that allow the development of alterations in the phenotype of the parasitized host, making it more exposed to predation, however these studies use archetypal or genetically modified strains of the parasite, without description of the behavioral effect of non-archetypal strains, which are highly prevalent in South America, especially in Brazil. In our study, we compared the behavioral and neurophysiological effect of archetypal strains (ME49 and VEG) and non-archetypal strains (#175 and #318) in Balb/c mice, which were evaluated in two distinct periods of infection using different parameters, as body weight; humoral immune response by ELISA; brain parasitic load by qPCR; learning and memory by the Inhibitory Avoidance test; locomotion by the Open Field test; olfactory preference (innate fear) by the Y-maze test and brain glucose metabolism by 18F-FDG PET imaging exam in three cerebral regions (Forebrain, Midbrain and Hindbrain). Our data showed that infection with the archetypal VEG strain induced a greater humoral immune response and a greater cerebral parasite load. Regarding the behavioral parameters, we did not observe cognitive alterations between the groups, however the groups infected by the VEG and #175 strains presented locomotion deficits. Regarding the olfactory preference for the predator's odor, which is the crucial event of behavioral manipulation we observed that only animals infected with non-archetypal strains #175 and #318 showed attraction to the feline's odor. The PET 18F-FDG imaging exam showed no differences between the groups for the three evaluated areas. Our data were inedited and demonstrated a strain-dependent effect on behavioral changes of rodents infected by genetically distinct strains of *T. gondii*.

Descriptors: Toxoplasmosis. *Toxoplasma gondii*. Behavior control. Animal experimental infection. Animal behavior. Glucose metabolism. PET 18F-FDG.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> com enfoque na transmissão parasitária via carnivorismo.	30
Figura 2-	Diversidade gênica da população de <i>T. gondii</i> em diferentes áreas geográficas.	32
Figura 3-	Circuito cerebral do medo condicionado. Desenho hipotético dos circuitos cerebrais de memorização (linhas pretas) e sua integração com a percepção do estímulo aversivo (choque nas patas – linhas azuis).	38
Figura 4-	Circuito cerebral do medo inato (odor felino). Desenho esquemático da memorização do medo do predador (linhas laranjas), juntamente com a unidade basal de formação de memória (linhas pretas).	40
Figura 5-	Mecanismos de invasão de <i>T.gondii</i> no parênquima cerebral. A) Esquema da barreira hematoencefálica e do parênquima cerebral saudáveis. B) Demonstração dos três mecanismos de entrada de <i>T. gondii</i> no parênquima cerebral conhecidos atualmente.	42
Figura 6-	Diferenças entre neurônios, astrócitos e micróglia no combate ao <i>T. gondii</i> . Os neurônios são mais susceptíveis à colonização parasitária.	43
Figura 7-	Possível mecanismo neuroimunológico para alteração da dopamina no SNC de roedores infectados por <i>T. gondii</i> .	44
Figura 8-	Mecanismo do metabolismo das moléculas de glicose e ¹⁸ F-FDG celular.	49
Figura 9-	Instalações do biotério de experimentação da FCMSC-SP. (A). Animais alojados em caixas plásticas mantidas em estante aberta. (B). Enriquecimento ambiental com rolos de papelão.	60
Figura 10-	Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> em câmara Neubauer, aumento de 40x.	61
Figura 11-	Linha do Tempo do Delineamento Experimental	63
Figura 12-	Ilustração do delineamento experimental	63
Figura 13-	Ambientação dos animais na ante-sala do biotério da FCMSCSP	64

Figura 14-	Esquiva Inibitória. (A). Vista superior do equipamento, mostrando os compartimentos claro e escuro. (B) Imagem da tela de comando com os dados da programação do teste.	66
Figura 15-	Vista superior do Campo Aberto, mostrando os quadrantes demarcados no piso do equipamento.	67
Figura 16-	Vista superior do teste de Labirinto em Y, mostrando os saches com odor do predador (braço com marcação vermelha) e com odor neutro (braço com marcação branca) e a área de contenção do aparato.	68
Figura 17-	Fórmula matemática para o cálculo de preferência olfativa dos animais durante o teste de Labirinto em Y.	69
Figura 18-	Imagem do exame PET 18F-FG. (A) Vista da frente do equipamento, mostrando os animais aquecidos por lâmpada incandescente. (B) Vista dos animais durante o exame.	72
Figura 19-	Curva de Sobrevivência dos grupos experimentais.	75
Figura 20-	Peso em gramas (g) dos animais ao longo do período experimental.	76
Figura 21-	Resultados da detecção de anticorpos IgG anti - <i>T. gondii</i> por ELISA nos dois períodos experimentais.	77
Figura 22-	Resultados da detecção da carga parasitária de <i>T. gondii</i> no SNC nos dois períodos experimentais.	78
Figura 23-	Tempo de imobilidade no teste de Campo Aberto com seis semanas de infecção.	79
Figura 24-	Tempo de permanência na área central do Campo Aberto com seis semanas pós-infecção.	80
Figura 25-	Dados de locomoção e exploração vertical dos grupos experimentais no teste de Campo Aberto com seis semanas pós-infecção.	81
Figura 26-	Avaliação da quantidade de <i>pellets</i> fecais e tempo de <i>grooming</i> no teste de Campo Aberto com seis semanas pós-infecção.	82
Figura 27-	Tempo de imobilidade observado no teste de Campo aberto com dezesseis semanas pós-infecção.	83
Figura 28-	Tempo de permanência na área central do Campo Aberto com dezesseis semanas pós-infecção.	84

Figura 29-	Dados de locomoção dos grupos experimentais no teste de Campo Aberto com dezesseis semanas pós-infecção.	85
Figura 30-	Avaliação da quantidade de <i>pellets</i> fecais e tempo de <i>grooming</i> no teste de Campo Aberto com dezesseis semanas pós-infecção.	85
Figura 31-	Resultados do teste de Esquiva Inibitória, referente à latência de entrada dos animais no ambiente aversivo/escuro. Dados do treino, teste realizado após noventa minutos, teste realizado após vinte e quatro horas.	86
Figura 32-	Resultados do cálculo da razão da preferência olfativa pela urina de gato, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com seis semanas pós-infecção.	87
Figura 33-	Porcentagem do tempo de permanência de cada grupo experimental nas três regiões do Labirinto em Y realizado com seis semanas de infecção, utilizando urina de gato.	88
Figura 34-	Resultados do cálculo da razão de preferência olfativa referente a urina de gato, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com dezesseis semanas de infecção.	89
Figura 35-	Porcentagem do tempo de permanência de cada grupo experimental nas três regiões do Labirinto em Y realizado com dezesseis semanas de infecção, utilizando urina de gato.	90
Figura 36-	Resultados do cálculo da razão de preferência olfativa referente ao amino ácido L-Felinina, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com seis semanas de infecção.	91
Figura 37-	Porcentagem do tempo de permanência nas três regiões do Labirinto em Y em relação a avaliação da L-Felinina. Resultados obtidos do teste realizado com seis semanas de infecção.	92
Figura 38-	Resultados do cálculo da razão de preferência olfativa referente ao amino ácido L-Felinina, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com dezesseis semanas de infecção.	93
Figura 39-	Porcentagem do tempo de permanência nas três regiões do Labirinto em Y em relação a avaliação da L-Felinina. Resultados obtidos do teste realizado com dezesseis semanas pós-infecção.	94
Figura 40-	Resultados de captação do radiofármaco pelo exame PET ¹⁸ F-FDG. Imagens adquiridas nos planos coronal, sagital e axial para os diferentes grupos experimentais.	96

Figura 41- Resultados da comparação da captação do radiofármaco ^{18}F -FDG entre as três regiões encefálicas (Forebrain, Midbrain e Hindbrain) para os diferentes grupos experimentais. 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹⁸F-FDG	Fluorodesoxiglicose
3D	Três dimensões (eixos x, y e z)
AAh2	Gene de hidroxilase de aminoácido aromático
BLA	Amígdala Basolateral
BMAp	Região caudal do núcleo basomedial da amígdala
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CEA	Amígdala Central
Células T-reg	Células T reguladoras
cm	Centímetros
CT	Threshold cycle – ciclo limiar
df	Graus de liberdade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay – Ensaio Imunoenzimático
F	Fator do teste Anova, razão de duas variâncias
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLUT1	Transportador de Glicose 1
HIPv	Hipocampo ventral

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
iRBD	Transtorno comportamental idiopático REM
m	Metro
M	Molar
mA	Mili-Ampére
Macrófagos M2	Componente do Sistema Imune Inato
MBq	Megabecquerel
mCi	Milicurie
MEApv	Região posteroventral do núcleo medial da amígdala
mg/Kg	Miligrama por peso
MHDs	Sistema defensivo hipotalâmico medial
min	Minuto
ml	Mililitro
NF-κB	Potenciador de cadeia leve de fator nuclear kappa de células B ativadas
NMDAR	Receptor N-metil-d-aspartato
OPD	O-phenylenidiamine
P. I	Pós Infecção

PAGd	Porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal
PAGvl	Porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal
PB	Núcleo parabraquial
PBS	Solução de tampão de fosfato
PBST	PBS-Tween-20
PET	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
pH	Potencial de Hidrogênio
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase de transcrição reversa quantitativa
s	Segundo
SD	Desvio Padrão
SNC	Sistema Nervoso Central
SUV	Standardized Uptake Value Valor de Absorção padronizado
T2	Tempo de relaxamento T2 – sequência T2 de Ressonância Magnética
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µM	Micrômetro
VMHdm	Hipotálamo Ventromedial parte Dorsomedial

VOIS

Volumes de interesse

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

°C	Graus Celsius
CO₂	Dióxido de Carbono
%	Porcentagem
HCL 4N	Ácido clorídrico 4N
TE	Tris-HCl 10 mM, pH. 8,0; EDTA 1 mM

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 . CARACTERÍSTICAS GERAIS DO <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	28
2.2. CICLO DE VIDA E FORMAS DE TRANSMISSÃO	29
2.3. DIVERSIDADE GENÉTICA E VIRULÊNCIA DE <i>T. GONDII</i>	30
2.4. <i>TOXOPLASMA GONDII</i> E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM ROEDORES	34
2.4.1. <i>Manipulação Comportamental</i>	34
2.4.2. <i>Estudos Comportamentais em Animais Infectados com T. gondii</i>	35
2.4.2.1. Atividade Locomotora e Exploratória	35
2.4.2.2. Aprendizagem e Memória condicionadas	37
2.4.2.3. Fenômeno da “Atração Fatal”	39
2.4.3. <i>Alterações Neurofisiológicas da Infecção por Toxoplasma gondii</i>	42
2.4.4. <i>Toxoplasmose e Aspectos Comportamentais e Neurofisiológicos: comparação entre diferentes cepas</i>	46
2.5. <i>Exame de Imagem PET – ¹⁸F - FDG e sua Contribuição no Estudo da Toxoplasmose</i>	48
3. JUSTIFICATIVA	53
4. OBJETIVOS	57
4.2. GERAL.....	57
4.3. ESPECÍFICOS	57
5. MATERIAIS E MÉTODOS	59
5.1. ANIMAIS.....	59
5.2. PREPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULOS	61
5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	62
5.4. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	64
5.4.1. <i>Teste de Esquiva Inibitória</i>	65
5.4.2. <i>Teste de Campo Aberto</i>	66
5.4.3. <i>Teste de Labirinto em Y</i>	67
5.5. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	69
5.6. QUANTIFICAÇÃO DE PARASITAS CEREBRAIS	70
5.6.1. <i>Extração e purificação do DNA para qPCR</i>	70
5.6.2. <i>Quantificação de parasitas cerebrais de camundongos BALB/c por RT-qPCR</i> 70	
5.6.3. <i>Determinação do limite de detecção</i>	71
5.7. EXAME DE IMAGEM PET ¹⁸ F-FDG.....	71
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
6. RESULTADOS	75
6.1 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA	75
6.2 PESAGEM DOS ANIMAIS.....	76
6.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL POR ELISA, DETECÇÃO DE ANTICORPOS TOTAIS.	77
6.4 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA CEREBRAL POR QPCR EM TEMPO REAL 78	
6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA PELO TESTE DE CAMPO ABERTO.	79

6.5.1	<i>Resultados do teste de Campo Aberto com seis semanas de infecção</i>	79
6.5.2	<i>Resultados do teste de Campo Aberto com dezesseis semanas de infecção</i>	82
6.6.	AVALIAÇÃO DA APRENDIZAGEM E MEMÓRIA CONDICIONADA PELO TESTE DE ESQUIVA INIBITÓRIA	86
6.7	AVALIAÇÃO DA AVERSÃO AO ODOR FELINO PELO TESTE DE LABIRINTO EM Y	87
6.7.1	<i>Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 6 semanas de infecção utilizando urina de gato</i>	87
6.7.2	<i>Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 16 semanas de infecção utilizando urina de gato</i>	89
6.7.3	<i>Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 6 semanas de infecção utilizando L-Felinina</i>	91
6.7.4	<i>Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 16 semanas de infecção utilizando L-Felinina</i>	93
6.8	RESULTADOS IMAGEM PET ¹⁸ F-FDG	95
7.	DISCUSSÃO	99
8.	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXOS	125

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) é um parasita eurixeno, capaz de infectar uma ampla variedade de animais de sangue quente, incluindo o homem (Dubey, 2010). Os felinos são os hospedeiros definitivos do protozoário, pois é no epitélio intestinal destes animais que ocorre a fase sexuada do agente. A principal via de infecção dos felinos é o carnivorismo pela ingestão de presas infectadas com o protozoário (Webster, 2007; Webster e McConkey, 2010).

Estudos em modelos experimentais têm demonstrado que a relação parasita - hospedeiro é uma associação complexa, que pode resultar em manipulação comportamental¹. Tal mecanismo, visa o aumento do sucesso do fitness ecológico² da população parasitária, aumentando sua chance de reprodução e sobrevivência (Bhattarai et al., 2021).

Nas últimas décadas, vários estudos demonstraram que roedores infectados por *T. gondii* apresentam alterações comportamentais que ocasionam maior risco predatório (Lamberton; Donnelly; Webster, 2008), como hiperatividade locomotora (Hodková et al., 2007; Afonso; Paixão; Costa, 2012), redução da ansiedade (Afonso; Paixão; Costa, 2012; Gonzales et al., 2007), mudanças de memória e aprendizagem (Wang et al., 2011; Goodwin et al., 2012; Bezerra et al., 2019). Além disso, algumas pesquisas, ainda, observaram hipoatividade locomotora em animais infectados por *T. gondii* (Gonzalez et al., 2007, Bezerra et al., 2019), demonstrando que a infecção pelo protozoário pode alterar vários aspectos comportamentais de forma diferenciada.

Dentre as alterações comportamentais induzidas por *T. gondii* no hospedeiro, certamente, a redução do medo inato dos roedores ao odor dos felinos é a mais relevante (Vyas et al., 2007a). Este efeito da manipulação do parasita leva a um comportamento alterado do hospedeiro, que se sente atraído pelo odor da urina de

¹ Manipulação comportamental; trata-se das alterações comportamentais observadas nos hospedeiros parasitados por alguns tipos de organismos, no qual, há o desenvolvimento de adaptações que visam o aumento da transmissão do parasita para outros hospedeiros (Chieffi, 2015).

² Fitness é um conceito chave para a teoria da Evolução e de modo simplista é caracterizado como a capacidade de sobrevivência e de reprodução de um organismo. Atualmente esse conceito ganhou conotações matemáticas, ajudando a prever a consequência de uma mudança em uma característica individual, ou em um conjunto de indivíduos e seu efeito em relação ao processo evolutivo da espécie em questão (Hansen, 2018).

seu predador natural, configurando o fenômeno conhecido como “atração fatal” (Berday; Webster; Macdonal, 2000). Estudos demonstram que essa redução da aversão é específica, já que a aversão natural ao odor de outros predadores como cão (Kannan et al., 2010), fuinha (Lamberton; Donnelly; Webster, 2008) e coelho (Vyas et al., 2007a) foram mantidas preservadas (Vyas et al., 2007b). Essa preferência pelo odor do felino, também, foi descrita em humanos, uma vez que indivíduos soropositivos para *T. gondii* demonstraram uma predileção olfativa à urina de gato doméstico em comparação com a urina de outros animais. Esse achado foi associado ao aminoácido L-felinina (Flegr et al., 2011) que é encontrado na urina de felinos da subfamília *Felinae* e está relacionado à demarcação territorial, prevalecendo em maiores concentrações em indivíduos machos (Hendriks et al., 1995).

Estudo prévio do nosso grupo demonstrou que camundongos infectados por *T. gondii* apresentaram diminuição da aversão ao odor da urina de gato macho e, também, ao aminoácido L - felinina (Bezerra et al., 2019). Em relação ao processo neurofisiológico responsável pela redução da aversão ao odor do felino em animais parasitados por *T.gondii*, Berday, Webster e Macdonal (2000) atribuíram esse fenômeno a mudanças na sinalização e decodificação do sinal olfativo em áreas específicas do SNC, como amígdala medial e giro denteado do hipocampo.

Contudo, vale ressaltar que o desenvolvimento das alterações comportamentais em roedores parasitados por *T. gondii* é um fenômeno complexo que depende de vários mecanismos neurofisiológicos. Inicialmente, foi postulado que tais alterações seriam resultado do aumento dos níveis de dopamina induzido pelo parasita nas células neurais tanto em modelos de infecção “*in vitro*” como “*in vivo*” (Prandovszky et al., 2011). Entretanto, com o avanço das pesquisas na área, foi possível verificar o papel de outros mecanismos, tais como: (i) efeito da lesão tecidual no SNC nos locais onde os cistos estão presentes (Koçak et al., 2012); (ii) infiltrado inflamatório cerebral e aumento dos níveis de citocinas que influenciam o metabolismo de neurotransmissores (Na; Jung; Kim, 2014); (iii) ativação da micróglia e dos astrócitos que alteram o microambiente neural (Dellacasa-Lindberg et al., 2011) e (iv) resposta autoimune que induz a produção de anticorpos anti-NMDAR com potencial de atacar células neurais do próprio hospedeiro (Li et al., 2018).

Cabe enfatizar, ainda, que as alterações comportamentais em roedores podem ser influenciadas por outros fatores, entre eles, o sexo do hospedeiro, tempo de infecção, carga parasitária e a cepa infectante (Xião et al., 2012; Harron et al., 2011; Kannan et al., 2010; González et al., 2007; Ingram et al., 2013; Bezerra et al., 2019). Em relação ao último aspecto, acredita-se que as alterações comportamentais sejam influenciadas pelo genótipo da cepa de *T. gondii* que o hospedeiro alberga. O estudo pioneiro, nesta área, foi realizado por Kannan e colaboradores (2010), que observaram diferenças comportamentais entre animais infectados por duas cepas do tipo II distintas (ME49 e PRU). Da mesma forma, um estudo, comparando animais infectados por uma cepa RH geneticamente atenuada (RH Δ rop5) com animais infectados pela cepa CEP do tipo III, demonstrou que ambos os grupos apresentaram alterações comportamentais que resultaram na atração pelo odor do felino. Em estudos prévios do nosso grupo, também, observamos o efeito do genótipo da cepa infectante no comportamento dos animais (Bezerra et al., 2019), demonstrando que a infecção pela cepa arquetípica VEG (tipo III) resultou em maior carga parasitária cerebral e maior título de anticorpos em camundongos BALB/c, além de induzir alterações comportamentais mais proeminentes quando comparada com a infecção pela cepa arquetípica ME49 (tipo II), porém, até o presente momento, não há descrição de estudos, desta natureza, utilizando cepas não arquetípicas de *T. gondii*, que são altamente prevalentes em nosso meio tanto em infecções animais como em casos humanos.

Para compreendermos a complexa ação de *T. gondii* no SNC é necessário o emprego de diferentes abordagens diagnósticas, incluindo métodos histológicos, moleculares e imunológicos, além da aplicação de novas tecnologias como os exames de imagem. A técnica de PET scan (tomografia computadorizada por emissão de pósitrons) com o radiofármaco ^{18}F -FDG (fluorodesoxiglicose) vem se destacando nos últimos anos, sendo amplamente utilizada para o estudo de doenças neurodegenerativas, já que avalia o metabolismo da glicose cerebral em repouso, permitindo a identificação de áreas do SNC com hipometabolismo, o que auxilia na prevenção de atrofia cerebral em diferentes formas de demência (Herholz, 2003; González-Redondo et al., 2014; Liguori et al., 2019). Contudo, estudos utilizando essa metodologia para avaliação dos efeitos causados pela infecção por *T. gondii* no SNC de modelos experimentais são extremamente escassos. O único estudo descrito com

essa finalidade foi realizado por Xu et al., (2014) que demonstraram que animais infectados por *T. gondii* apresentaram um aumento da captação do radiofármaco na fase aguda de infecção, indicando que, possivelmente, a ativação da micróglia e o processo neuroinflamatório que ocorrem, neste período da infecção, sejam os mecanismos responsáveis pelo aumento da captação.

Levando em consideração os achados da literatura referentes às alterações comportamentais em animais infectados e a influência da infecção por *T. gondii* em vários transtornos psiquiátricos humanos, como esquizofrenia (Torrey e Yolken, 2003; Torrey e Yolken, 2007; Horacek et al., 2012), transtorno bipolar (Tedla et al., 2011), depressão e tentativa de suicídio (Hsu; Groer; Beckie, 2014), doença de Alzheimer, transtorno obsessivo compulsivo, Parkinson (Kusbeci et al, 2011; Miman et al., 2010; Çelik et al., 2010;) e certas epilepsias de origem desconhecida (Carter, 2013), buscamos avaliar o efeito do genótipo da cepa infectante de *T. gondii* nas alterações comportamentais, utilizando modelos de infecção experimental em camundongos Balb/c com cepas arquetípicas do tipo II (ME 49) e tipo III (VEG), bem como cepas não arquetípicas (#175 e #318), isoladas de casos de toxoplasmose congênita, a fim de avaliar possíveis alterações no comportamento locomotor, memória, aprendizagem e aversão ao odor felino, bem como analisar o metabolismo cerebral em diferentes regiões encefálicas pelo exame de imagem PET ¹⁸F-FDG durante a fase crônica de infecção.

Os dados do presente estudo são pioneiros e fornecem um panorama inédito do efeito comportamental de cepas não arquetípicas, comparadas com cepas arquetípicas de *T.gondii*, além de estabelecer uma abordagem promissora para futuras pesquisas que possam utilizar técnicas de imagem, visando maior compreensão do estado fisiológico neuronal e sua possível influência no comportamento de roedores, possibilitando uma visão translacional para humanos.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características Gerais do *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao reino *Protista*, filo *Apicomplexa*, subclasse *Coccidia*, família *Sarcocystidae* e gênero *Toxoplasma* (Montoya e Liesenfeld, 2004, Karthikeyan et al., 2021).

O parasita apresenta três formas evolutivas durante seu ciclo de vida, incluindo oocistos, taquizoítos e bradizoítos: existem três formas evolutivas do parasita (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Os oocistos são formados nas células intestinais de felinos infectados, sendo liberados nas fezes desses animais na forma não esporulada (não infectante). Essas estruturas apresentam grande potencial de contaminar água e superfície de vegetais, que podem ser consumidos por outros animais e pelo homem. Os oocistos esporulados de *T. gondii* são formados por 2 esporocistos, cada qual contendo 4 esperozoítos no seu interior (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Os taquizoítos são formas de multiplicação rápida, presentes na fase aguda da infecção, sendo responsáveis pela invasão de diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro (Hill e Dubey, 2014; Montoya e Liesenfeld, 2004). Após a ingestão de esporozoítos presentes em oocistos, ou bradizoítos contidos nos cistos teciduais, estas estruturas se diferenciam em taquizoítos, cuja principal característica é a capacidade de multiplicação rápida, ocasionando rompimento da célula parasitada e concomitante liberação de novos taquizoítos que invadirão células vizinhas, caracterizando a fase aguda de infecção (Montoya e Liesenfeld, 2004).

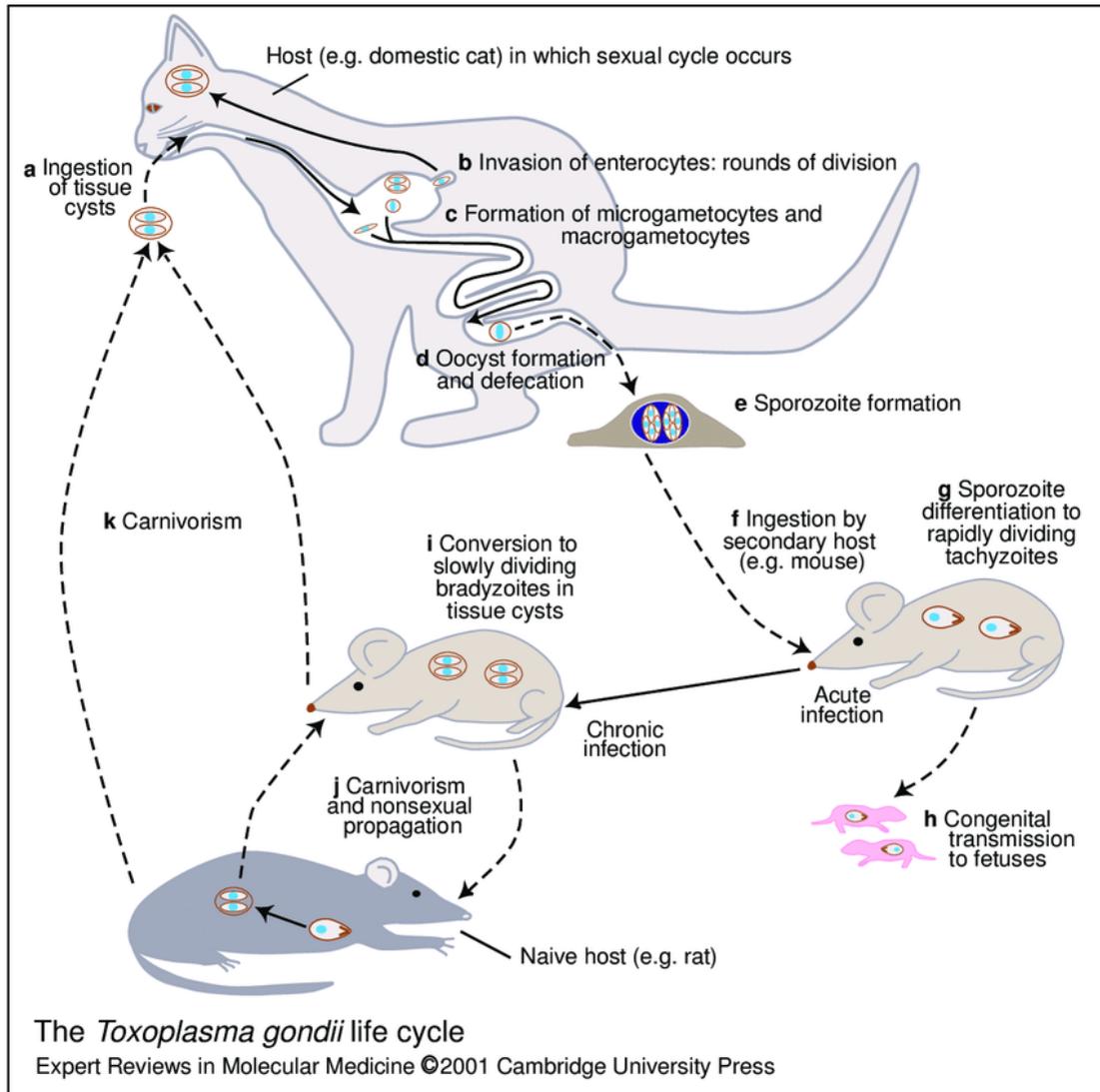
Os bradizoítos apresentam menor taxa de multiplicação e são capazes de formar cistos teciduais, sobretudo, no tecido nervoso, olhos, tecido muscular e cardíaco do hospedeiro (Ahmad-Saleh et al., 2016). O desenvolvimento da resposta imune frente aos taquizoítos é um fator determinante para transformação destas estruturas em bradizoítos. O bradizoíto representa a forma evolutiva mais resistente à ação enzimática. Além disso, apresenta pequenas diferenças na expressão gênica em comparação com os taquizoítos (Hill e Dubey, 2014; Montoya et al., 2004).

De acordo com Dubey (2010), cerca de um terço da população mundial já teve contato com *T. gondii*, porém em indivíduos imunocompetentes a doença apresenta caráter benigno e autolimitado com cerca de 90% dos indivíduos assintomáticos. Por outro lado, em indivíduos imunossuprimidos, e em fetos infectados congenitamente, a doença apresenta curso grave e potencialmente fatal. A toxoplasmose é uma das doenças oportunistas que mais causa encefalite em indivíduos HIV positivos (Remington et al., 2011; Montoya e Liesenfeld, 2004, Vidal, 2019).

2.2. Ciclo de vida e formas de transmissão

Os felinos são os hospedeiros definitivos do parasita e, quando infectados, excretam oocistos imaturos (não infectantes) nas fezes, os quais se tornaram infectantes cerca de 1 a 5 dias após sua liberação no ambiente (CDC, 2020), contaminando a superfície de alimentos e a água que podem ser ingeridos por outros animais. *T. gondii* tem a capacidade de infectar todas as espécies de animais de sangue quente, incluindo o homem (Hodkova et al., 2007; Murray et al., 2004; Montoya e Liesenfeld, 2004; Hill e Dubey, 2014).

A principal fonte de infecção dos felinos é a ingestão de presas (roedores e pássaros) infectadas, contendo cistos teciduais do parasita (Fig. 1) (Webster, 2007; Webster e McConkey, 2010). No Brasil, estudos demonstram que as taxas de soropositividade de roedores urbanos para o *T. gondii* variam de 0,46% a 5% em cidades como São Paulo e Londrina (Muradian et al., 2012; Ruffolo et al., 2008). Mundialmente, Galeh et al., (2020) revisando estudos de soroprevalência em roedores selvagens de diferentes países, verificaram uma taxa global de 6% (IC95% = 6 - 7%), sendo os maiores níveis encontrados na África (24%) e na América do Sul (18%), que, curiosamente, são regiões subdesenvolvidas e com maior biodiversidade. Segundo Mercier et al., (2013), as taxas de soroprevalência em pequenos roedores é variável e depende de diversos fatores, incluindo características ambientais, parasitárias e do próprio hospedeiro e determinar a importância de cada um deles na transmissão do parasita para os felinos, por meio do carnivorismo, não é uma tarefa fácil, demandando o desenvolvimento de várias pesquisas de campo. Galeh et al., (2020) ressaltam que mesmo a taxa de soropositividade sendo baixa, os roedores são extremamente importantes, pois servem como bioreservatórios do parasita para os felinos.



Fonte: Ajioka et al. (2001).

Figura 1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* com enfoque na transmissão parasitária via carnivorismo.

A infecção por *T. gondii* no homem ocorre, principalmente, pela ingestão de carne crua ou malcozida, contendo cistos teciduais, ou pelo consumo de água e alimentos contaminados com oocistos do parasita ou, ainda, pela via transplacentária. Outras formas menos frequentes de transmissão são transfusão sanguínea, transplante de órgãos e acidente laboratorial (Hill e Dubey, 2014; CDC.org, 2010).

2.3. Diversidade genética e virulência de *T. gondii*

Um fator extremamente relevante para o desfecho da infecção em animais e humanos é a virulência da cepa infectante do parasita e esta questão está diretamente relacionada com a variabilidade gênica da população de *T. gondii*. Estudo pioneiro,

conduzido por Howe e Sibley (1995), com isolados provenientes da Europa e América do Norte, demonstraram que os genótipos circulantes, nestas regiões, eram clonais, sendo classificados em três linhagens arquetípicas (tipo I, II e III), com diferenças em suas sequências genômicas em torno de 2% (Dardé, 2008). Embora essa classificação, ainda, seja mencionada, sabe-se que a estrutura populacional atual de *T. gondii* é muito mais complexa, com pelo menos 16 haplogrupos em todo o mundo (Su et al., 2012).

Um estudo de genotipagem, realizado com 1457 isolados de *T. gondii*, provenientes de várias regiões do mundo, revelou, por PCR-RFLP, utilizando-se 10 marcadores moleculares, a existência de 189 genótipos diferentes do parasita circulando mundialmente (Shwab et al., 2014). Estes genótipos foram inseridos em uma plataforma de dados específica para *T. gondii*, denominada ToxoDb (<https://toxodb.org/toxo/app>) que, atualmente, contém o registro de 231 genótipos diferentes do parasita (ToxoDb.org, 2023).

Contudo, vale ressaltar que a distribuição mundial dos isolados de *T. gondii* não é um evento uniforme. Estudos demonstram que, no hemisfério norte, há uma variedade pequena de genótipos circulantes, com predomínio de alguns genótipos específicos, caracterizando uma estrutura populacional clonal de *T. gondii*. Por outro lado, no hemisfério sul, ocorre a presença de vários genótipos, porém sem dominância entre eles, representando um modelo de estrutura populacional epidêmica (Fig. 2) (Shwab et al., 2014). De acordo com o estudo sobre a diversidade genética de isolados de *T. gondii* provenientes de diferentes países, Schwab et al., (2014) demonstraram que os genótipos # 1 (Clonal de Tipo II), # 2 (Tipo III), # 3 (Variante de Tipo II) e # 10 (Tipo I) são identificados globalmente, porém alguns genótipos são predominantes em determinadas áreas geográficas como, por exemplo, os genótipos # 2 e # 3 dominam na África, os genótipos # 9 (chinês 1) e # 10 são mais prevalentes na Ásia, os genótipos # 1, # 2 e # 3 são dominantes na Europa e os genótipos # 1, # 2, # 3, 4 e # 5 (# 4 e # 5 são conhecidos como Tipo 12) dominam na América do Norte. Já nas Américas Central e do Sul, não há dominância de um genótipo específico (Shwab et al., 2014; Dardé et al., 2014).

disseminação do agente no organismo do hospedeiro. Este processo está correlacionado com a habilidade do protozoário em atravessar barreiras epiteliais, disseminando-se via corrente sanguínea; (ii) tempo de multiplicação parasitária no interior da célula hospedeira, o que poderia influenciar na evolução e prognóstico da doença (Barragan e Sibley, 2002, 2003). Assim, levando-se em consideração o camundongo como hospedeiro, tem-se observado altas taxas de mortalidade quando esses animais são infectados por cepas arquetípicas do tipo I e maior sobrevivência quando são infectados por cepas arquetípicas do tipo II e III, que, frequentemente, ocasionam infecção crônica com formação de cistos teciduais (Boothroyd e Grigg, 2002). Contudo, vale ressaltar que a gravidade da doença não depende apenas da virulência das cepas de *T. gondii*, mas também, de características genéticas dos hospedeiros, que podem ser mais ou menos susceptíveis à infecção parasitária (Dardé, 2008; Maubon et al., 2008; Hill e Dubey, 2014).

Com relação às cepas não arquetípicas de *T. gondii*, apesar de não serem suficientemente avaliadas em ensaios experimentais, acredita-se que sejam mais virulentas (Dardé, 2008). Observações empíricas de casos humanos têm demonstrado que cepas sul-americanas apresentam alta virulência, já que estão associadas a casos fatais de toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes em países tropicais como Suriname (Demar et al., 2007) e Guiana Francesa (Carme et al., 2009). Estudos mais recentes, realizados em modelos animais, demonstraram que diferentes linhagens de camundongos (*M. m. musculus*, *M. m. castaneus* e *M. m. domesticus*) são resistentes à infecção por cepas arquetípicas de *T. gondii*, entretanto, estes animais foram susceptíveis à infecção por cepas não arquetípicas provenientes de diferentes áreas geográficas, indicando que a virulência de *T. gondii* depende de uma complexa relação entre o repertório genético do hospedeiro e a diversidade gênica do parasita (Hassan et al., 2019). Da mesma forma, um estudo realizado em camundongos Swiss, utilizando 10 cepas não arquetípicas de *T. gondii*, isoladas de casos humanos e de animais domésticos e selvagens da Guiana Francesa, juntamente com três cepas arquetípicas clássicas, RH (tipo I), PRU (tipo II) e VEG (tipo III), demonstrou que as cepas não arquetípicas foram mais virulentas do que as cepas arquetípicas do Tipo II e III, com exceção da cepa RH (tipo I), que é sabidamente virulenta para camundongos, indicando que as cepas não arquetípicas induzem infecções mais severas no hospedeiro (Simon et al., 2019).

2.4. *Toxoplasma gondii* e Alterações Comportamentais em Roedores

2.4.1. Manipulação Comportamental

Nas últimas décadas, vários estudos demonstraram que alguns parasitas são capazes de provocar alterações comportamentais estratégicas em seus hospedeiros para garantir a manutenção de seus ciclos de vida na natureza. A hipótese da manipulação comportamental é o modelo atual mais utilizado para definir o procedimento estratégico de sobrevivência desenvolvido por estes parasitas, pois pressupõe a necessidade de mecanismos adaptativos entre parasita e hospedeiro, uma vez que o comportamento alterado do hospedeiro poderia favorecer a disseminação do parasita, sobretudo, no padrão de transmissão presa - predador (Vyas e Sapolsky, 2010; Flegr et al., 2011; Chieffi, 2015). Segundo Kanková et al. (2007), a seleção natural, ao longo da história evolutiva do parasita e do seu hospedeiro, seria responsável por favorecer as características comportamentais que fossem vantajosas para as duas espécies.

Alguns exemplos de manipulação comportamental incluem o fungo *Dicrocoelium dendriticum*, que em seu ciclo biológico possui três tipos distintos de hospedeiros, porém evidências indicam que este fungo tem o potencial de alterar o comportamento de formigas (*Formica fusca*). Ao alcançar os subesofágicos das formigas, via hemolinfa, o fungo libera uma substância química, ainda, desconhecida que faz com que as formigas parasitadas permaneçam nas porções superiores das plantas ao anoitecer. Esse comportamento anormal aumenta a chance de animais herbívoros ingerirem, acidentalmente, a formiga infectada com o fungo durante o forrageio³. A infecção dos herbívoros proporciona a continuidade do ciclo biológico do fungo, que além de formigas e herbívoros, também pode infectar moluscos, como o caracol (Libersat; Kaiser; Emanuel, 2018).

Outro exemplo, é o trematódeo *Euhaplorchis californiensis* que manipula o comportamento do peixe da Califórnia (*Fundulus parvipinnis*). Peixes parasitados apresentam comportamentos alterados, como movimentos repentinos na superfície da água e torções corporais, responsáveis pela exposição do ventre prateado do

³ Forrageio, segundo Owen-Smith; Fryxell e Merrill (2010) esse comportamento é formado por ciclos de alimentação, interrompidos pela movimentação do animal visando achar novas fontes de recurso alimentar. No caso dos herbívoros, os animais encontram alimento na vegetação das pastagens.

animal que é refletido pela luz do sol. Tais modificações comportamentais aumentam o risco predatório do peixe infectado por aves piscívoras, que são hospedeiras definitivas do trematódeo. Evidências indicam tropismo deste parasita por áreas do SNC dos peixes relacionadas ao comportamento, como rombencéfalo, mesencéfalo e diencéfalo (Helland-Riise et al., 2020).

Da mesma forma, vários estudos têm demonstrado que *T. gondii*, também, é capaz de induzir alterações comportamentais, tornando seu hospedeiro intermediário (roedor) mais susceptível à predação pelo seu hospedeiro definitivo (felino), o que é extremamente importante, uma vez que a fase sexuada do seu ciclo biológico ocorre exclusivamente no epitélio intestinal dos felinos. Assim, ao alterar, estrategicamente, o comportamento do roedor, *T. gondii* estaria proporcionando sua transmissão para o felino por meio da interação presa - predador, permitindo a realização completa do seu ciclo de vida e da sua perpetuação (Yolken e Torrey, 2008; Webster, 2007; Webster e McConkey, 2010).

2.4.2. Estudos Comportamentais em Animais Infectados com *T. gondii*

A infecção por *T. gondii* pode provocar diversas mudanças no comportamento do hospedeiro infectado, incluindo, desde alterações nas atividades de locomoção e exploração, danos à aprendizagem e à memória condicionada, até o desenvolvimento do fenômeno de “atração fatal” (Webster, 2010).

2.4.2.1. Atividade Locomotora e Exploratória

Previamente à apresentação das principais alterações locomotoras e exploratórias causadas por *T. gondii* no hospedeiro, será realizada a descrição do teste de Campo Aberto (*Open Field*), que é um dos métodos de maior aplicabilidade em estudos comportamentais desta natureza. De acordo com Wilson et al. (1976), o teste de Campo Aberto permite a quantificação uniformizada da atividade locomotora e exploratória do animal durante sua exposição e permanência em ambiente desconhecido por um período de tempo determinado (Guizzo, 2009). Acredita-se que este teste tenha sido proposto, inicialmente, por Hall (1934) com o intuito de avaliar características emocionais dos roedores (Pruitt e Belzung, 2003). Segundo Hall (1934), a defecação e a micção são parâmetros que possibilitam a mensuração do estado emocional dos animais, já que esses processos fisiológicos podem ser influenciados

por estímulos emocionais que ativam o segmento Simpático do Sistema Nervoso Autônomo.

Atualmente, o teste de Campo Aberto tem sido amplamente utilizado em estudos pré-clínicos de diversas naturezas, já que permite a avaliação de múltiplas variáveis, como locomoção, atividade vertical, distância percorrida, tempo de exploração da área central e periférica do aparato (Crawley e Paylor, 1997). Outro aspecto emocional que pode ser avaliado por esta metodologia, é o comportamento de *grooming* ou autolimpeza, que ocorre como resposta fisiológica a uma situação de estresse do animal (Spruijt; Hoof; Gispen, 1992).

Apesar da popularidade do teste de Campo Aberto, nem sempre, os resultados dos estudos realizados em diferentes centros de pesquisa são concordantes (Carola et al. 2002). Isto ocorre porque o teste pode ser influenciado por alguns fatores, entre eles, o formato e tamanho da arena, iluminação local, presença de objetos no campo, familiaridade do animal com o aparato, período de duração e horário da realização do teste (Choleris et al., 2001; Prutt e Belzung, 2003).

Com relação à infecção por *T. gondii*, alguns estudos observaram um aumento da atividade locomotora em animais experimentalmente infectados pelo parasita. Acredita-se que o aumento da locomoção seja um comportamento de risco, pois permite melhor percepção do roedor pelo predador (felino), sendo considerada uma alteração comportamental que eleva o risco predatório (Afonso; Paixão; Costa, 2012; Farnworth; Innes; Waas, 2016).

Por outro lado, há estudos que demonstraram diminuição da locomoção em modelos experimentais de infecção por *T. gondii* (Gulinello et al., 2010; González et al., 2007, Bezerra et al., 2019). Além disso, a diminuição da atividade locomotora e exploratória, já foi descrita em modelos experimentais de depressão, sendo que, nos últimos anos, ocorreram vários relatos de comportamento depressivo em animais infectados por *T. gondii* (Mahmoud et al., 2017; Rehan et al., 2020; Toyoda, 2022 - dados não publicados).

Contudo, cabe ressaltar que a locomoção é uma atividade que, também, pode ser influenciada por alterações motoras. Gulinello et al. (2010) realizaram avaliações biomecânicas e observaram deambulação alterada em animais infectados por *T.*

gondii quando comparados com animais livres da infecção. Alterações biomotoras podem resultar na redução da locomoção, sendo um fator preditivo para o aumento do risco predatório do animal, uma vez que o sucesso predatório depende tanto do desempenho locomotor do predador, como da presa (Moore e Biewener, 2015).

2.4.2.2. Aprendizagem e Memória condicionadas

Aprendizagem e memória podem apresentar implicações importantes na sobrevivência dos animais, principalmente, em relação à capacidade de reconhecimento de estímulos e ambientes que podem representar tanto risco, como fontes essenciais de suprimentos à sua sobrevivência. Abaixo está uma das possíveis definições de memória e seu envolvimento com o processo de aprendizagem.

A memória é definida pelo dicionário Webster (1996) como “a capacidade ou faculdade mental de reter e reviver impressões, ou recordar e reconhecer experiências anteriores”. A memória é adquirida pelo processo de aprendizagem, durante o qual, as experiências causam mudanças duradouras no SNC (Goshen e Yirmiya, 2007 – versão traduzida).

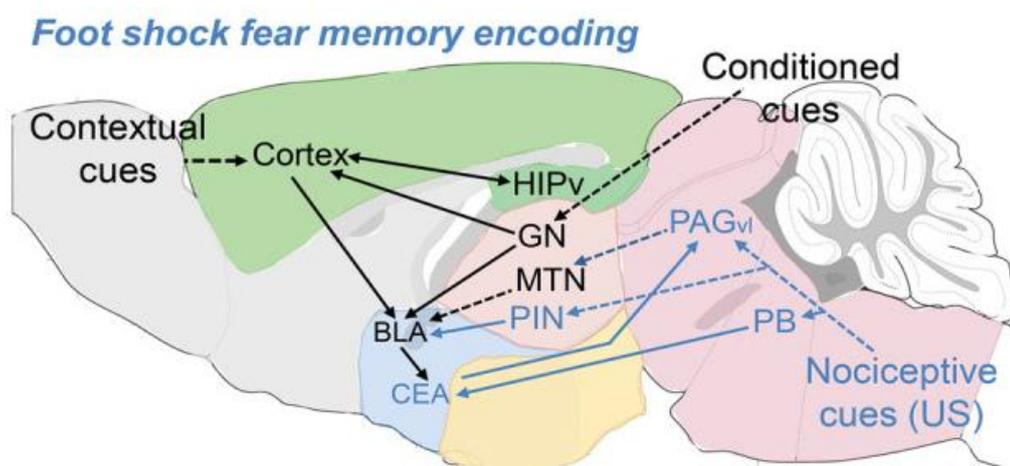
Outro conceito relevante, é a memória condicionada, que consiste no medo inato. Ter a capacidade de defesa frente a uma situação perigosa é extremamente importante para todas as espécies animais e, neste sentido, o medo inato representa o tipo de medo que já nasce com o animal, sem a necessidade de um processo de aprendizagem por parte do animal (Canteras et al., 2003).

Contudo, quando o animal é exposto a uma situação que induz seu medo inato, essa experiência ruim é memorizada, levando a mudanças permanentes no SNC. Por exemplo, quando um animal é colocado em um ambiente escuro de um aparato e recebe uma descarga elétrica nas patas, seu medo inato é estimulado, desencadeando um processo de aprendizado e memória, que associa os dois eventos, isto é, o medo inato com o ambiente, no qual ele ocorreu. Assim, a simples visualização do ambiente escuro é capaz de desencadear resposta de medo no animal. Esse tipo de medo é denominado “medo condicionado ou apreendido” (Silva et al., 2016). Um modo de avaliar a capacidade de aprendizagem e memorização do

medo condicionado em modelos experimentais, consiste no emprego do teste de Esquiva Inibitória.

O intuito principal do teste de Esquiva Inibitória é avaliar o comportamento do animal frente à exposição a uma situação aversiva, como uma descarga elétrica na pata, que irá induzir seu medo inato. Assim, quando o animal é ressubmetido ao mesmo ambiente e estímulo aversivo, acredita-se que a ausência de deambulação no compartimento aversivo do aparato, seja um indicativo de aprendizado e formação de memória condicionada (Berté, 2009; Wang et al., 2009, Wang et al., 2011).

Silva e colaboradores (2016) postulam que, durante o processo de aprendizado e memorização do estímulo aversivo, a informação condicionada, decorrente da passagem do animal pela área escura do aparato contendo o estímulo aversivo, seguida da informação nociceptiva de dor, provocada pela descarga elétrica nas patas, sejam eventos decodificados por diferentes áreas do SNC. Enquanto a primeira informação é transmitida por estímulos que chegam nas regiões córtico-talâmicas e são encaminhados para o complexo amígdala basolateral (BLA) e hipocampo ventral (HIPv), a segunda informação chega ao SNC pelo sistema de memorização córtico - amígdalo - hipocampal de forma, ainda, não elucidada, embora, acredita-se que a porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAGvl) tenha participação neste evento (Fig. 3).



Fonte: Silva et al. (2016)

Figura 3. Circuito cerebral do medo condicionado. Desenho hipotético dos circuitos cerebrais de memorização (linhas pretas) e sua integração com a percepção do estímulo aversivo (choque nas patas - linhas azuis).

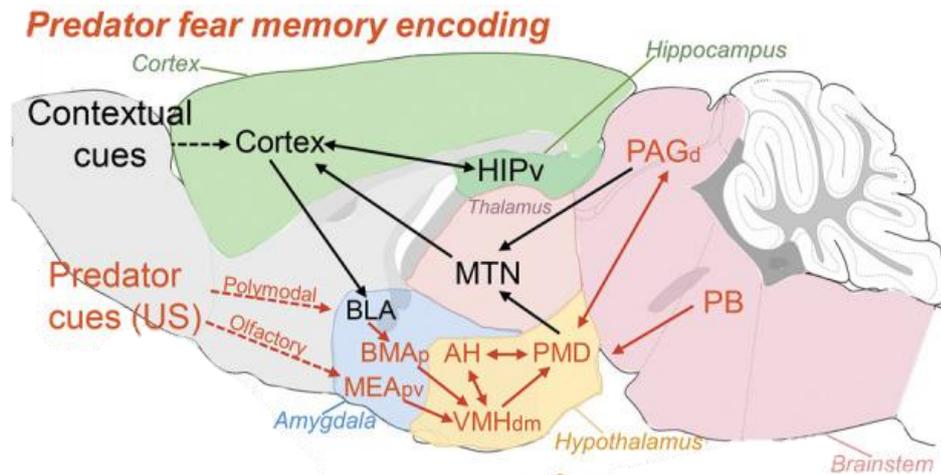
Estudos em camundongos com infecção congênita por *T. gondii* demonstraram que animais, provenientes de fêmeas infectadas na fase inicial e intermediária da gestação, apresentaram dificuldade de aprendizagem e de memória ao serem avaliados pelo teste de Esquiva Inibitória (Wang et al., 2011). Mahmoudvand et al. (2015), também, observaram dificuldade de aprendizagem e memória em camundongos BALB/c infectados com o parasita, sendo que esses animais apresentaram menor latência de entrada no ambiente aversivo, receberam maior número de descargas elétricas e permaneceram por maior tempo na área aversiva (escura) do aparato utilizado no teste de Esquiva Inibitória. Da mesma forma, um estudo do nosso grupo demonstrou que animais infectados com as cepas arquetípicas ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) de *T. gondii* apresentaram dificuldade de recuperação de memória de longo prazo no teste de Esquiva Inibitória (Bezerra et al., 2019).

Vale ressaltar que os danos, gerados pela infecção parasitária nos processos neurais de aprendizagem e memória, podem comprometer a sobrevivência dos animais, já que aumentam suas chances de exposição a situações de risco e à predação.

2.4.2.3. Fenômeno da “Atração Fatal”

A aversão ao odor de um predador evoca o medo inato do animal, ou seja, um padrão comportamental defensivo que não precisa ser previamente aprendido e está presente no genoma da espécie, servindo como um traço filogenético (Bedoya-Pérez et al., 2019, Silva et al., 2016).

Silva e colaboradores (2016) demonstraram diferenças no circuito neural referente ao processamento e memorização do odor do predador em relação à memorização condicionada. De acordo com os autores, as informações olfativas são transmitidas ao hipotálamo por meio da amígdala, ou pelo núcleo parabraquial (PB). O sistema defensivo hipotalâmico medial (MHDS) integra essas informações e desencadeia fortes respostas defensivas por meio de suas projeções para a porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (PAGd) (Fig. 4). Como pode-se constatar, há o envolvimento de várias estruturas localizadas na amígdala e hipotálamo, indicando uma participação mais expressiva do sistema límbico na decodificação e memorização de informações referentes ao odor do predador em roedores.



Fonte: Silva et al. (2016).

Figura 4. Circuito cerebral do medo inato (odor felino). Desenho esquemático da memorização do medo do predador (linhas laranjas), juntamente com a unidade basal de formação de memória (linhas pretas).

Desta forma, uma das alterações comportamentais mais intrigantes observada em roedores infectados por *T. gondii* é a redução da aversão ao odor do felino. Alterações da locomoção e ansiedade podem acarretar maior risco predatório geral, porém, a redução da aversão ao odor do felino demonstra uma mudança comportamental específica da presa (roedor), em relação ao predador felino, hospedeiro definitivo do *T. gondii*. Vários estudos demonstraram uma redução da aversão de roedores ao odor do felino (Vyas et al., 2007a; Vyas et al., 2007b; Kannan et al., 2010). Estes estudos compararam, ainda, 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 em roedores mostrou-se específica para o felino (Vyas et al., 2007a; Lamberton; Donnelly; Webster, 2008).

Não se sabe ao certo como a infecção pelo *T. gondii* modifica esse comportamento, porém algumas hipóteses foram formuladas. Um estudo, utilizando ratos machos expostos ao odor de felino e ao odor 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, mas expostos ao odor de fêmeas, indicando que o protozoário pode alterar a percepção e processamento do odor, causando, possivelmente, alterações no circuito do medo e da reprodução dos animais infectados (House et al., 2011).

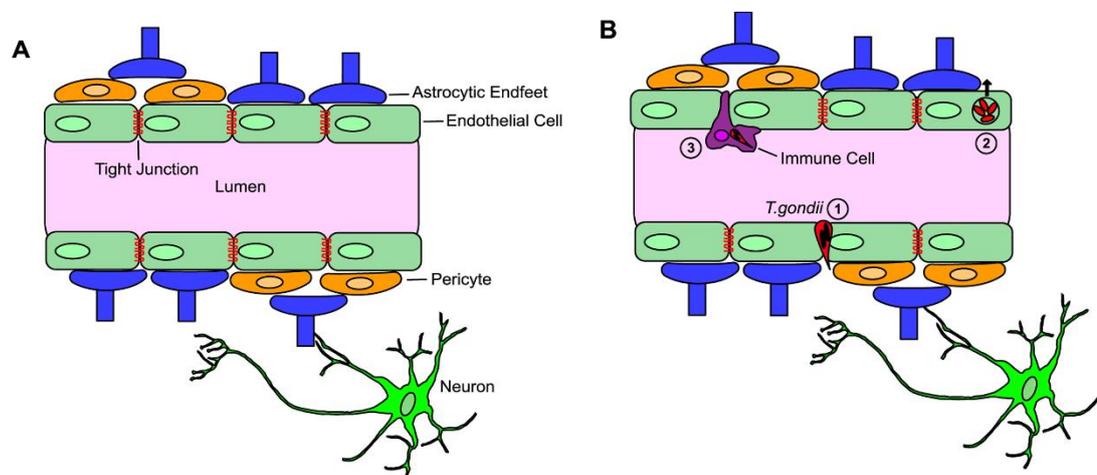
Flegr e colaboradores (2011) observaram que homens soropositivos para *T. gondii* apresentaram uma preferência olfativa pelo odor da urina de gato doméstico em comparação com o odor da urina de outros animais, sugerindo que o aminoácido L-felinina, secretado apenas na urina do gato doméstico, seja um dos fatores envolvidos nesse mecanismo. Postula-se que o aminoácido L-felinina seja responsável pelo odor de demarcação territorial dos felinos (Hendricks et al., 1995). Da mesma forma, Papes, Logan e Stowers (2010) demonstraram que algumas proteínas secretadas na urina de animais predadores funcionam como moléculas estimulantes do medo nas presas, propondo que o processamento olfativo dessas moléculas possa ser alterado em decorrência da infecção pelo *T. gondii*. Assim, avaliar essa questão é extremamente relevante para descobrir quais moléculas são importantes na relação presa - predador e como, eventualmente, a infecção parasitária pode alterar a atividade do SNC e o processamento da informação olfativa de tais moléculas.

Nos últimos anos, alguns estudos evidenciaram que outras espécies de mamíferos, também, podem apresentar redução do medo ao odor do felino quando estão infectadas por *T. gondii*. Um estudo observacional de campo demonstrou que hienas infectadas pelo parasita permanecem a menores distâncias dos leões, quando comparadas com hienas soronegativas para *T. gondii* (Gering et al., 2021). Recentemente, um estudo com primatas verificou que chimpanzés parasitados por *T. gondii* apresentaram uma preferência olfativa pela urina de leopardos que são seus predadores naturais (Poirotte et al., 2020). A pesquisa etológica de campo com animais selvagens, embora limitada, fornece fortes indícios de que as mudanças comportamentais em mamíferos são antigas, considerando o tempo evolutivo desses animais.

Contudo, há muitas questões referentes às alterações comportamentais de animais infectados pelo *T. gondii* que permanecem sem resposta. Neste sentido, os desafios parecem imensos, já que outros fatores, também, podem influenciar o comportamento dos animais parasitados, entre eles, a carga parasitária (González et al., 2007), o tempo de infecção (Haroon et al., 2012 e Kannan et al., 2010), o sexo do hospedeiro (Xião et al., 2012), os estímulos ambientais (Vyas et al., 2007b), além do genótipo da cepa infectante de *T. gondii* (Kanann et al., 2010; Ingram et al., 2013; Bezerra et al., 2019).

2.4.3. Alterações Neurofisiológicas da Infecção por *Toxoplasma gondii*

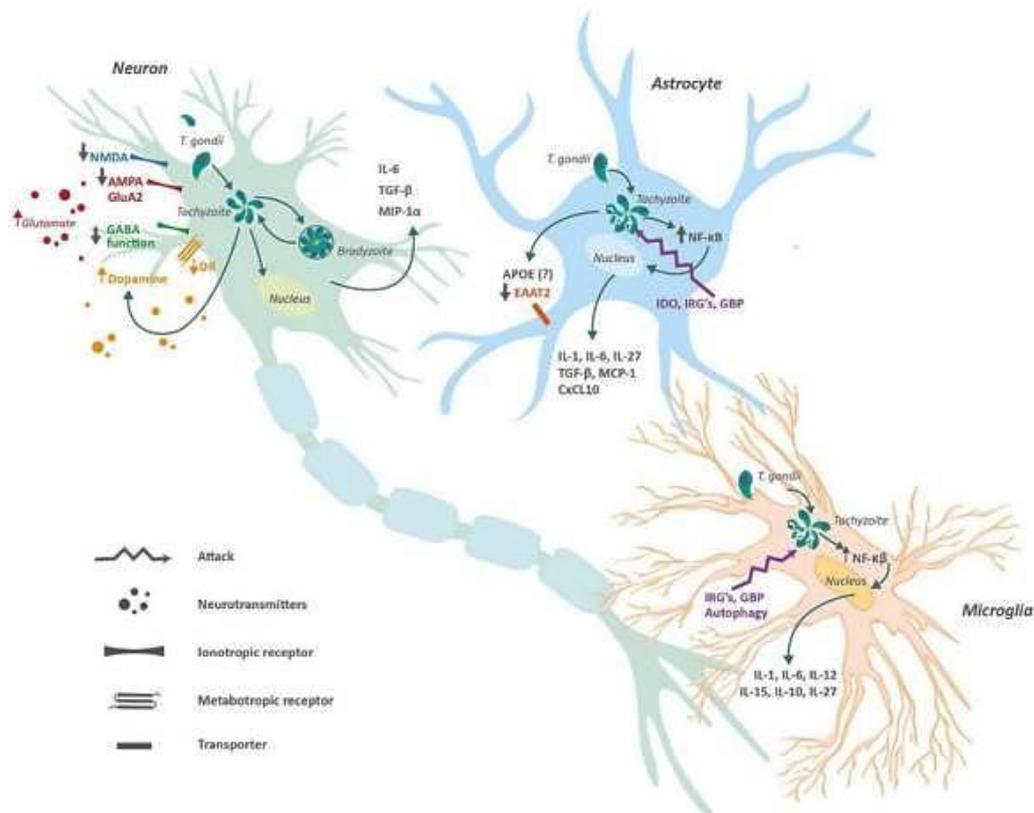
Para elucidar os possíveis eventos neurofisiológicos relacionados à infecção pelo *T. gondii*, é importante compreender os mecanismos de invasão do protozoário no SNC (Fig. 5). *T. gondii* invade o SNC do hospedeiro por meio da barreira hematoencefálica, utilizando três possibilidades distintas, a saber: (i) os parasitas atravessam mecanicamente as fissuras das junções entre as células da barreira hematoencefálica; (ii) parasitas livres na corrente sanguínea infectam as células endoteliais da barreira hematoencefálica, ocasionando o rompimento dessa estrutura e acesso ao parênquima cerebral; (iii) mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”, responsável pela invasão do SNC por células do sistema imune que carregam os parasitas para o interior do parênquima cerebral (Mendez e Koshy, 2017; Ortiz-Guerrero et al., 2020).



Fonte: Mendez e Koshy (2017).

Figura 5. Mecanismos de invasão de *T. gondii* no parênquima cerebral. A) Esquema da barreira hematoencefálica e do parênquima cerebral saudáveis. B) Demonstração dos três mecanismos de entrada de *T. gondii* no parênquima cerebral conhecidos atualmente.

Atualmente, sabe-se do potencial do parasita em infectar células como astrócitos, micróglia e neurônios, entretanto, essa última população celular é a mais afetada devido a sua reduzida capacidade de estabelecer uma resposta imune eficiente contra o parasita, diferentemente, dos outros tipos celulares citados, que podem rapidamente controlar a infecção, secretando diversas citocinas (Fig. 6) (Ortiz-Guerrero et al., 2020).

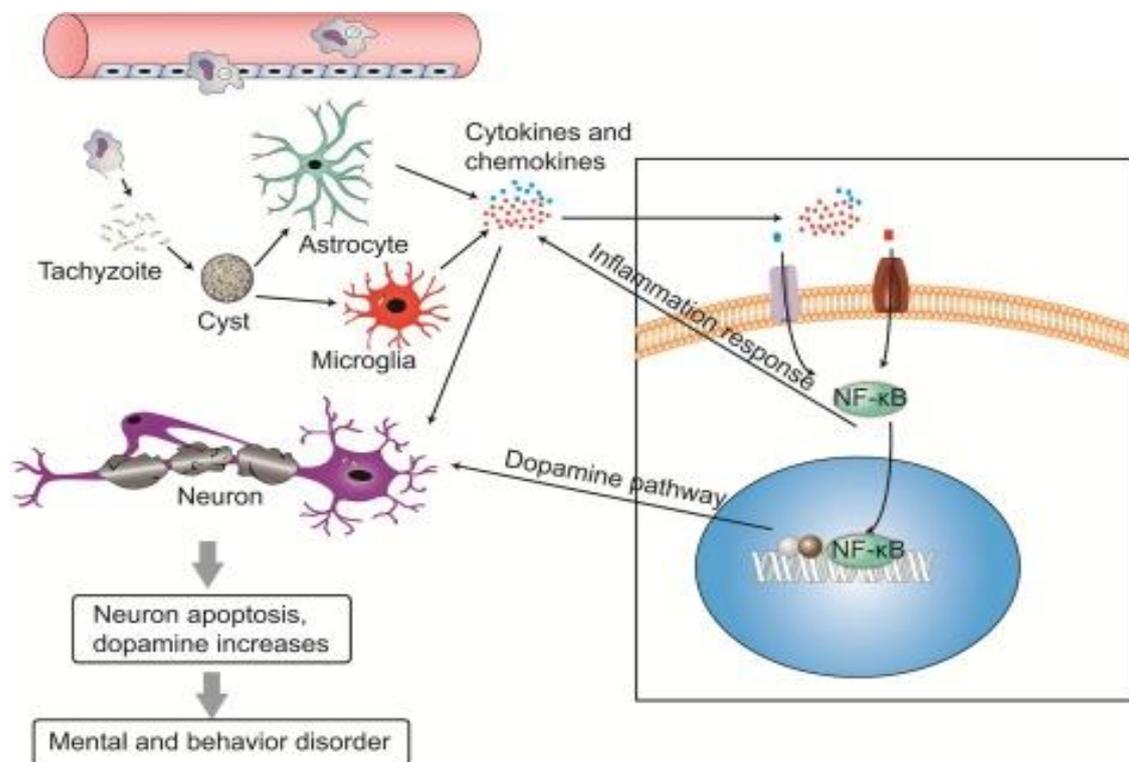


Fonte: Ortiz-Guerrero et al. (2020)

Figura 6. Diferenças entre neurônios, astrócitos e micróglia no combate ao *T. gondii*. Os neurônios são mais susceptíveis à colonização parasitária.

Assim, com a invasão do SNC e colonização neuronal pelo parasita, diversas alterações neurofisiológicas são observadas, uma vez que a infecção altera os níveis de diferentes neurotransmissores como demonstrado na figura 6 (Ortiz-Guerrero et al., 2020). Inicialmente, acreditava-se que a alteração comportamental observada em roedores infectados ocorria devido ao aumento dos níveis de dopamina, observados tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, atribuindo-se esse aumento à presença de dois genes no genoma de *T. gondii*, que codificam a enzima tirosina hidroxilase, homóloga a dos mamíferos, e responsável pela velocidade de síntese desse neurotransmissor (Prandovszky et al., 2011). Entretanto, tal premissa é questionável, já que mesmo com a deleção de um desses genes (AAh2), os níveis de dopamina mantiveram-se elevados e os animais experimentais continuaram apresentando alterações comportamentais. Desta forma, estudos mais recentes têm proposto que fatores inerentes à resposta imune do hospedeiro poderiam estar relacionados à elevação dos níveis de dopamina (McFarland et al., 2018). Esse fenômeno foi confirmado pelos

resultados obtidos por Wang e colaboradores (2019) que demonstraram ativação da micróglia e astrócitos do SNC de camundongos infectados por *T. gondii*. A ativação dessas células resulta na liberação de citocinas e quimiocinas que estimulam a via NF- κ B⁴ da resposta inflamatória, acarretando aumento da expressão de dopamina bem como da apoptose neuronal (Fig.7).



Fonte: Wang et al. (2019).

Figura 7. Possível mecanismo neuroimunológico para alteração da dopamina no SNC de roedores infectados por *T. gondii*.

Contudo, outros mecanismos, também, podem estar relacionados ao aumento da dopamina no SNC. Estudos relataram redução da expressão de norepinefrina em animais infectados por *T. gondii* (Wang et al., 2019; Laing; Blanchard; McConkey, 2020), demonstrando que a infecção pelo parasita pode provocar uma diminuição da enzima responsável pela síntese desse neurotransmissor a partir da dopamina, levando à diminuição do metabolismo da dopamina e, conseqüentemente, seu acúmulo no cérebro (Laing; Blanchard; McConkey, 2020). Tong et al. (2021)

⁴ NF- κ B: Potenciador de cadeia leve de fator nuclear kappa de células B ativadas. É extremamente importante para a resposta imune, pois expressa genes pró-inflamatórios que codificam citocinas e quimiocinas, além de outras funções de regulação da resposta imune (Liu et al., 2017).

demonstraram que a elevação dos níveis de dopamina, juntamente, com os níveis aumentados de arginina vasopressina na amígdala cerebral provocam redução do medo dos animais, tornando-os mais expostos ao predador.

A infecção por *T. gondii* pode comprometer a atividade de outros neurotransmissores. Wang e colaboradores (2019) relataram redução dos níveis de serotonina e aumento de epinefrina no SNC de animais infectados pelo parasita. Da mesma forma, alterações glutamatérgicas⁵ foram evidenciadas pela presença de anticorpos anti-NMDAR que afetam a disponibilidade e capacidade de internalização dos receptores NMDAR⁶, comprometendo a sináptica nervosa (Li et al., 2018). Além disso, alterações no sistema GABAérgico⁷, com diminuição do controle inibitório neural, também, já foram descritas (Bhandage; Kanatani; Barragan, 2019). Acredita-se que o GABA esteja relacionado à motilidade celular. Na vigência da infecção por *T. gondii*, as células microgliais apresentam maior motilidade e migração, indicando que esse evento poderia facilitar a disseminação do parasita pelo parênquima cerebral (Bhandage; Kanatani; Barragan, 2019).

Além do efeito no metabolismo e atividade cerebral de neurotransmissores, *T. gondii* pode modular as alterações comportamentais de acordo com sua carga de cistos no cérebro do hospedeiro infectado. Estudos têm demonstrando que quanto maior a carga parasitária cerebral, mais proeminentes são as mudanças comportamentais provocadas pela infecção (Boillat et al., 2020; Bezerra et al., 2019). Contudo, a questão primordial dos cistos cerebrais de *T. gondii* leva em consideração o fato de haver, ou não, um tropismo desses cistos por regiões específicas do SNC. Estudos recentes relataram maior quantidade de cistos na região do córtex cerebral, embora esse fenômeno não seja um dogma (Li et al., 2019; Wang et al., 2019; Boillat et al., 2020; Castaño-Barrios et al., 2021). Por outro lado, a observação da atração ao odor do felino por animais infectados com a cepa RH Δ rop5, geneticamente atenuada e não cistogênica, é um achado importante, pois evidencia que a presença do cisto

⁵ Glutamato: é um neurotransmissor abundante no SNC com função excitatória das células neurais (Zhou e Danbolt, 2014).

⁶ NMDAR: Receptor N-metil-d-aspartato, altamente expresso no cérebro, é um canal iônico que possui duas subunidades: GLUN1 e GLUN2 (e seus subtipos), que se liga ao Glutamato (Li et al., 2018).

⁷ GABA: além de ser um neurotransmissor inibitório, o GABA também está relacionado a funções de motilidade e migração celular dentro do SNC (Azuma et al., 2003 e Wheeler et al., 2011).

no SNC não deve ser considerada a única razão responsável pela manipulação comportamental em animais infectados por *T. gondii* (Ingram et al., 2013). Este achado sugere que outros fatores, entre eles, a resposta imune do hospedeiro, podem ter implicações neurofisiológicas importantes no desenvolvimento das alterações comportamentais (Flegr, 2007).

Após a instalação do parasita no SNC, ocorre ativação de células da micróglia e astrócitos, além do recrutamento de linfócitos T e células mononucleares periféricas (Parlog; Schlüter; Dunay, 2015). A ativação das células imunológicas leva à liberação de diversas citocinas que podem alterar a síntese de neurotransmissores (Tonin et al., 2014).

Com relação à neuroplasticidade, estudos realizados por Parlog et al. (2014) demonstraram uma redução dendrítica em células do córtex e hipocampo de camundongos C57/BL6 infectados com a cepa ME49. Da mesma forma, Mitra, Sapolsky e Vyas (2013) observaram retração dendrítica na amígdala basolateral de ratos infectados pela cepa do tipo II (PRU). A alteração na amígdala basolateral tem relação direta com os níveis de corticosterona⁸, uma vez que essa estrutura apresenta conexão com os núcleos hipotalâmicos, responsáveis pela secreção do glicocorticóide. A redução da matriz da amígdala basolateral ocasiona diminuição dos níveis de corticosterona. Na literatura, a redução da corticosterona está associada à diminuição da ansiedade, corroborando com diversos estudos que demonstraram redução da ansiedade em animais infectados pelo *T. gondii* (Afonso; Paixão; Costa, 2012; Gonzalez et al., 2007).

2.4.4. Toxoplasmose e Aspectos Comportamentais e Neurofisiológicos: comparação entre diferentes cepas

Todos os mecanismos descritos anteriormente são importantes para elucidação das alterações neurofisiológicas provocadas por *T. gondii* em seus hospedeiros intermediários, porém, é provável que não sejam os únicos meios responsáveis pelas mudanças comportamentais do hospedeiro. Vários estudos têm demonstrado que o genótipo da cepa infectante apresenta um efeito significativo no

⁸ Corticosterona: é um glicocorticóide, que em humanos é denominada cortisol. Essas moléculas participam da ativação do eixo HPA (Hipotálamo-pituitária-adrenais) e participam da regulação da resposta fisiológica ao stress (Morgado et al., 2017).

desenvolvimento das alterações comportamentais e fisiológicas em modelos experimentais (Tonin et al., 2012; Ingram et al., 2013; Bezerra et al., 2019). O marco inicial das pesquisas envolvendo o papel da diversidade genética de *T. gondii* no comportamento de roedores foi atribuído ao estudo conduzido por Kannan e colaboradores (2010) que compararam o efeito da infecção em camundongos por duas cepas do tipo II (PRU e ME49). Embora infectados com cepas do mesmo genótipo, os animais manifestaram alterações de comportamento distintas. As mudanças comportamentais foram mais proeminentes nos roedores infectados pela cepa PRU, já que esses animais apresentaram maior atividade locomotora e exploratória, além de redução persistente da aversão ao odor do felino. Do mesmo modo, o estudo conduzido por Bezerra et al., (2019) demonstrou que animais infectados com diferentes cepas arquetípicas ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) manifestaram disparidades de comportamento, com efeito mais acentuado no grupo infectado com a cepa VEG. A infecção por esta cepa induziu maior resposta imune humoral e maior carga parasitária cerebral em comparação com a infecção pela cepa ME49. Além disso, os animais infectados pela cepa VEG apresentaram diminuição da memória de longo prazo e redução da aversão ao odor do felino (Bezerra et al., 2019). Ingram e colaboradores (2013), também, observaram redução da aversão ao odor do felino em animais infectados pelas cepas CEP (tipo III) e RH Δ rop5 (atenuada geneticamente). Estes achados sugerem que a redução da aversão ao odor do predador é um efeito marcante da infecção por *T. gondii*.

Embora escassos, os estudos comportamentais voltados para a diversidade genética das cepas de *T. gondii* em modelo murino têm fornecido dados importantes sobre os aspectos imunológicos, neurofisiológicos e de colonização cerebral por diferentes cepas do parasita. Tonin et al. (2012) avaliaram a carga parasitária e fatores relacionados à resposta imunológica, como infiltração de células imunes periféricas, no cérebro de animais infectados pelas cepas RH (tipo I), ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) e constataram que a infecção pela cepa VEG resultou em maior infiltrado inflamatório e maior número de cistos cerebrais em comparação com a infecção pela cepa ME49, corroborando com os dados de Bezerra et al. (2019) e Ingram et al. (2013) que, também, verificaram que a infecção por cepas do tipo III induzem maior carga parasitária cerebral e maior quantidade de infiltrado inflamatório no SNC. Estes achados indicam que as infecções por cepas do tipo III são mais eficientes na

colonização cerebral, provocando um processo inflamatório mais intenso, que resulta em alterações comportamentais mais acentuadas (Tonin et al., 2012; Ingram et al., 2013).

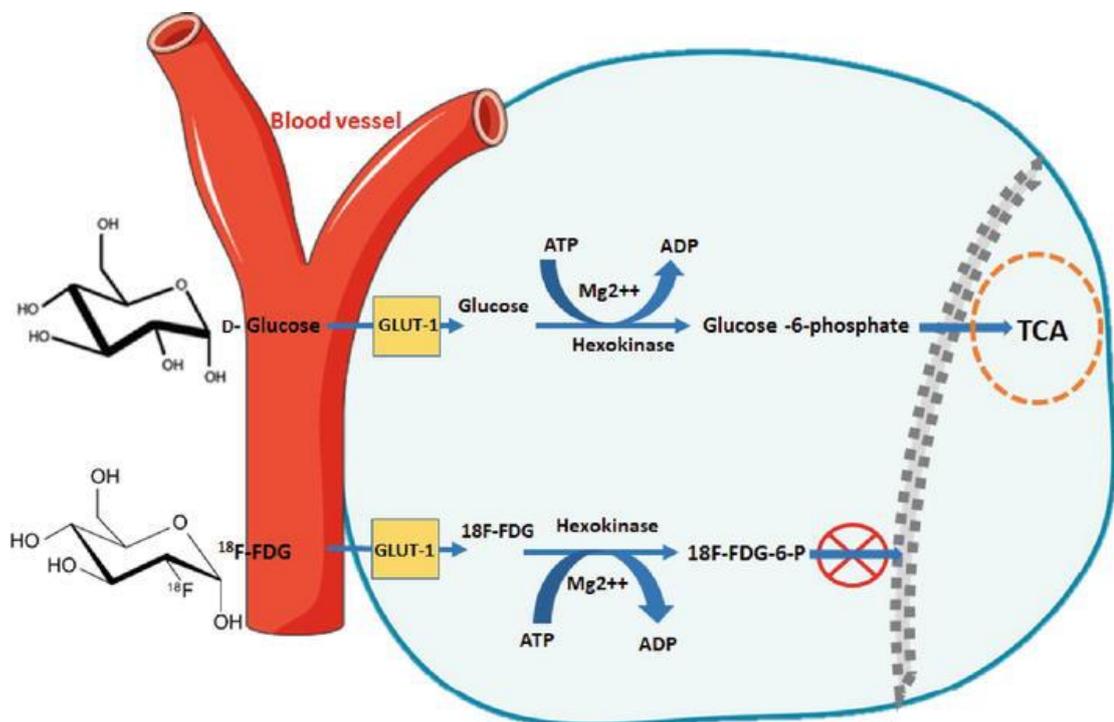
A diferença no padrão da resposta imunológica do hospedeiro frente à diversidade de genótipos de *T. gondii* é um fator importante que poderia elucidar o comportamento diferenciado dos animais. Segundo Mukhopadhyay; Arrang-Solís e Saeji (2020), a diferença na expressão de proteínas da roptria pelas cepas do tipo II e III explicaria o fato de isolados do tipo III serem mais imunogênicos. Cepas do tipo III não produzem ROP 18, que auxilia na sinalização de fatores imunológicos de controle da resposta imune, incluindo citocinas anti-inflamatórias. Assim, a infecção pela cepa CEP (tipo III) induz níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e menor quantidade de macrófagos M2 e células T reguladoras em comparação com a infecção pela cepa PRU (tipo II) (Mukhopadhyay; Arrang-Solís e Saeji 2020). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que o processo neuroinflamatório é extremamente importante para o desenvolvimento das alterações comportamentais e neurofisiológicas observadas em animais infectados por *T. gondii* (Laing; Blanchard; McConkey, 2020; Tong et al., 2021).

Nos últimos anos, a busca pelo conhecimento científico acerca dos mecanismos relacionados às alterações comportamentais e neurofisiológicas provocadas pela infecção por *T. gondii* gerou achados importantes para compreensão da manipulação comportamental, sobretudo, em modelos experimentais infectados por cepas arquetípicas, ou geneticamente modificadas do parasita. Contudo, permanecem, ainda, à luz da ciência, lacunas sobre o conhecimento do efeito das infecções causadas por cepas não arquetípicas de *T. gondii*, que são frequentemente relatadas na América do Sul, em especial, no Brasil.

2.5. Exame de Imagem PET – ¹⁸F - FDG e sua Contribuição no Estudo da Toxoplasmose

Atualmente, os exames de imagem têm fornecido uma contribuição notória para a neurociência. Neste contexto, o exame de imagem PET (Tomografia por emissão

de Pósitrons) tem sido utilizado com diferentes radiofármacos⁹, com finalidade diagnóstica ou terapêutica. O exame PET ^{18}F - FDG (fluorodesoxiglicose) utiliza uma molécula semelhante à glicose. Ao ser injetada no organismo, a molécula ^{18}F - FDG se liga ao mesmo receptor da glicose (Glut1), permitindo sua internalização na célula, onde será metabolizada pela hexoquinase, formando o composto ^{18}F -FDG-G -P que, diferentemente da Glucose-6-fosfatase, resultante da metabolização da glicose pela hexoquinase, não entra na mitocôndria, permanecendo acumulado no citosol celular (Fig.8). Esse acúmulo permite a captação e mensuração do radiofármaco pelo aparelho de imagem em diferentes órgãos e sistemas (Komal et al., 2019).



Fonte: Komal et al. (2019).

Figura 8. Mecanismo do metabolismo das moléculas de glicose e ^{18}F -FDG celular.

A formação da imagem do PET ^{18}F -FDG advém da reação de aniquilação que ocorre quando o pósitron que é emitido pelo Flúor-18 colide com elétrons presentes no organismo, resultando na formação de dois fótons que são captados por detectores

⁹ Radiofármaco: composto radioativo formado por um radionucleotídeo (isótopo radioativo), responsável pela emissão de radiação, ligado quimicamente a uma molécula não radioativa que apresenta afinidade por um determinado órgão ou sistema, sendo utilizado com finalidade diagnóstica ou terapêutica (Vital et al., 2019).

do aparelho e convertidos em sinais elétricos. Esses sinais elétricos são decodificados e reconstruídos em imagens 3D que mostram o local exato da aniquilação do radiofármaco (Dias et al., 2020).

Nos casos de infecção por *T. gondii*, o exame de imagem PET ^{18}F -FDG tem sido descrito, principalmente, em indivíduos portadores do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (Kim et al., 2010; Menendez et al., 2000), já que para este grupo de pacientes, a toxoplasmose é considerada uma doença oportunista grave e potencialmente fatal. O vírus HIV compromete o sistema imunológico do hospedeiro, permitindo a reativação de cistos latentes do parasita e a reagudização da doença que, nestes casos, é caracterizada por manifestações graves como a encefalite. Além disso, já foram descritas alterações de comportamento em indivíduos coinfectados pelo vírus HIV e *T. gondii* (Marcus et al., 2021).

O exame de imagem PET ^{18}F -FDG tem sido empregado, também, no diagnóstico diferencial entre linfoma e toxoplasmose cerebral. Como o linfoma apresenta uma atividade metabólica alta, é esperado que a captação do radiofármaco, neste caso, seja maior que a captação encontrada em infecções do SNC. Nestes casos, o exame de imagem PET ^{18}F -FDG é extremamente valioso, pois auxilia a elucidação do quadro, evitando procedimentos diagnósticos invasivos (Marcus et al., 2021).

Até o presente momento, apenas um estudo utilizou o exame de imagem PET ^{18}F -FDG em modelos experimentais de toxoplasmose (Xu et al., 2014). Esse estudo demonstrou um aumento generalizado da captação do radiofármaco no SNC de ratas prenhes com infecção aguda por *T. gondii*. A ativação da micróglia e astrócitos, decorrente da infecção do SNC pelo parasita, poderia elucidar o aumento do metabolismo da glicose cerebral observado nos animais. Este achado é resultado do processo neuroinflamatório desencadeado por *T. gondii* (Xu et al., 2014). Contudo, não há descrição de estudos voltados para avaliação do metabolismo cerebral da glicose em modelos de infecção crônica por *T. gondii*.

Neste sentido, estudos envolvendo técnicas de imagem são extremamente promissores para compreensão dos eventos neurofisiológicos provocados pelo

parasita e sua possível correlação com alterações comportamentais de roedores, abrindo novas perspectivas de atuação científica.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a infecção por *T. gondii* tem sido proposta como modelo para estudos de alterações comportamentais em roedores (Yolken e Torrey, 2008; Webster, 2007; Webster e McConkey, 2010). Esta proposição leva em consideração o carácter heteroxeno do parasita, que depende da infecção de hospedeiros intermediários (roedores) e do hospedeiro definitivo (felino) para manutenção do seu ciclo vital.

A hipótese da manipulação comportamental é a teoria mais factível, na atualidade, para elucidar as mudanças comportamentais induzidas por *T. gondii* em seus hospedeiros intermediários (Webster, 2007; Webster e McConkey, 2010; Flegr et al., 2011). Segundo Holmes e Bethel (1972), essa teoria pode ser aplicada aos parasitas que apresentam o modelo, presa - predador, como via de transmissão natural. Assim, ao manipular o fenótipo do seu hospedeiro intermediário (HI), *T. gondii* facilita sua transmissão para o hospedeiro definitivo (HD), garantindo sua permanência em uma determinada região geográfica ou ecossistema.

Para manipular o comportamento dos roedores (HI), tornando-os mais suscetíveis à predação pelo felino (HD), *T. gondii* pode modificar várias características do padrão de comportamento das presas, como locomoção (Afonso; Paixão; Costa, 2012; Gulinello et al., 2010; González et al., 2007, Bezerra et al., 2019), memória e aprendizado (Goodwin et al., 2012; Bezerra et al., 2019), além da perda do medo inato ao odor de felinos (Vyas et al., 2007a; Vyas et al., 2007b; Kannan et al., 2010).

Em humanos, a infecção por *T. gondii* é considerada um fator preditivo para o desenvolvimento de vários transtornos mentais e comportamentais que variam desde alterações sutis de personalidade até transtornos graves como esquizofrenia (Torrey e Yolken, 2003; Torrey e Yolken, 2008; Horacek et al., 2012); transtorno bipolar (Tedla et al., 2011); depressão e suicídio (Torrey e Yolken, 2003; Hsu; Groer; Beckie, 2014); transtorno obsessivo compulsivo (Brynska et al., 2001; Miman et al., 2010); comportamento de risco como acidentes de trânsito (Flegr et al., 2002; Yereli et al., 2006; Flegr et al., 2009) e doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson (Miman et al., 2010) e doença de Alzheimer (Kusbeci et al., 2011). Esses transtornos afetam, consideravelmente, a qualidade de vida dos pacientes, representando um

sério problema de Saúde Pública, pois sobrecarregam os sistemas de Saúde, acarretando prejuízos econômicos em decorrência dos custos elevados com tratamento e cuidados paliativos (Nasrallah, 2021).

A gravidade da infecção por *T. gondii* tem sido associada a processos imunológicos desencadeados no SNC, já que o parasita consegue transpor a barreira hematoencefálica colonizando o tecido cerebral do hospedeiro (Mendez e Koshy, 2017; Ortiz-Guerreo et al., 2020). A presença de *T. gondii* no SNC induz a liberação de fatores pró-inflamatórios (Na; Jung; Kim, 2014), além da ativação de células específicas, como micróglia e astrócitos, desencadeando alterações neurofisiológicas importantes (Dellacasa-Lindberg et al., 2011). Da mesma forma, o parasita pode alterar o metabolismo e a funcionalidade de neurotransmissores, comprometendo a neuroplasticidade da sinapse nervosa, o que poderia resultar em transtornos mentais e comportamentais em humanos (Prandovsky et al., 2011; Na; Jung; Kim, 2014).

Como os estudos de comportamento humano são laboriosos e, na maioria das vezes, limitados por questões éticas, o modelo experimental animal, sobretudo, o murino, tem sido amplamente utilizado para avaliação das alterações comportamentais causadas por *T. gondii*, sendo imprescindíveis para determinar os fatores da interação parasita -hospedeiro, responsáveis pelas alterações comportamentais do hospedeiro parasitado. Dentre os aspectos inerentes ao hospedeiro, é importante ressaltar que as alterações comportamentais podem ser influenciadas pelo sexo (Xião et al., 2012) e repertório genético do animal (Hassan et al., 2018). Em relação ao parasita, os principais fatores que interferem na manipulação comportamental são a carga parasitária (González et al., 2018; Boillat et al., 2020) e o genótipo da cepa infectante (Kannan et al., 2010; Ingram et al., 2013; Bezerra et al., 2019).

Vários estudos têm demonstrado que a estrutura populacional de *T. gondii* apresenta alta diversidade genética, com implicações diretas na virulência dos genótipos do parasita e desfecho clínico da doença (Su et al., 2010; Shwab et al., 2014; Shwab et al., 2018). O genótipo da cepa infectante de *T. gondii*, por sua vez, pode interferir nas alterações comportamentais do hospedeiro. Estudo conduzido por Bezerra et al. (2019) demonstrou que a infecção pela cepa arquetípica VEG (tipo III) foi capaz de provocar alterações comportamentais mais proeminentes em

camundongos Balb/c do que a infecção pela cepa arquetípica ME49 (tipo II). Além disso, a infecção pela cepa VEG induziu maior resposta imune humoral e maior carga parasitária cerebral. Estes achados foram corroborados por estudos recentes que verificaram que cepas arquetípicas do tipo II e III induzem um padrão de resposta imune distinto, afetando de forma diferenciada o SNC do hospedeiro (Laing; Blanchard; McConkey, 2020; Tong et al., 2021). Contudo, não há descrição de estudos voltados para avaliação do efeito de cepas não arquetípicas de *T. gondii* no comportamento do hospedeiro.

Atualmente, com o advento dos exames de imagem, os efeitos neurofisiológicos causados pela infecção por cepas geneticamente distintas de *T. gondii* em modelo experimental murino podem ser avaliados pelo PET ^{18}F - FDG, já que esse exame possibilita a detecção do metabolismo celular em diferentes tecidos. Estudo conduzido por Xu et al. (2014), utilizando PET ^{18}F - FDG, demonstrou um aumento generalizado da captação do radiofármaco no SNC de camundongos com infecção aguda por *T. gondii*, porém não há dados na literatura sobre o padrão metabólico cerebral de animais em fase crônica da infecção. Neste estudo, buscamos avaliar o efeito do genótipo da cepa infectante de *T. gondii* nas alterações comportamentais e neurofisiológicas de camundongos Balb/c infectados com cepas arquetípicas do tipo II (ME 49) e tipo III (VEG) e cepas não arquetípicas (#175 e #318), a fim de verificar possíveis alterações no comportamento locomotor, memória, aprendizagem e aversão ao odor felino, além de analisar o metabolismo cerebral em diferentes regiões encefálicas pelo exame de imagem PET ^{18}F -FDG durante a fase crônica de infecção.

Compreender o impacto das alterações comportamentais e neurofisiológicas induzidas por cepas não arquetípicas em roedores, seria extremamente relevante, já que essas cepas são altamente prevalentes na América do Sul, sobretudo, no Brasil. Assim, esse estudo poderia prover dados inéditos, possibilitando uma visão translacional para casos humanos da doença.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.2. Geral

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

4.3. Específicos

- a) Desenvolver modelos de infecção experimental em camundongos BALB/c com cepas arquetípicas (ME49 - tipo II e VEG - tipo III) e cepas não arquetípicas (#175 e #318) de *T. gondii*;
- b) Avaliar a evolução das infecções através da detecção de anticorpos IgG anti - *T. gondii* por ELISA;
- c) Avaliar o peso corporal dos animais ao longo do período experimental por meio de pesagens programadas;
- d) Quantificar por qPCR a carga parasitária cerebral das diferentes cepas de *T. gondii* em dois períodos distintos da infecção (seis e dezesseis semanas);
- e) Avaliar o efeito de cada infecção na atividade locomotora e exploratória dos animais pelo teste de Campo Aberto em dois períodos distintos da infecção (seis e dezesseis semanas);
- f) Avaliar o efeito de cada infecção na capacidade de aprendizagem e memória do medo condicionado pelo teste de Esquiva Inibitória em dois períodos distintos da infecção (seis e dezesseis semanas);
- g) Avaliar o efeito de cada infecção no medo inato ao odor do predador felino pelo teste de Labirinto em Y em dois períodos distintos da infecção (seis e dezesseis semanas);
- h) Avaliar o metabolismo da glicose cerebral em diferentes regiões do SNC pelo exame de imagem PET ¹⁸F -FDG com dezessete semanas de infecção.

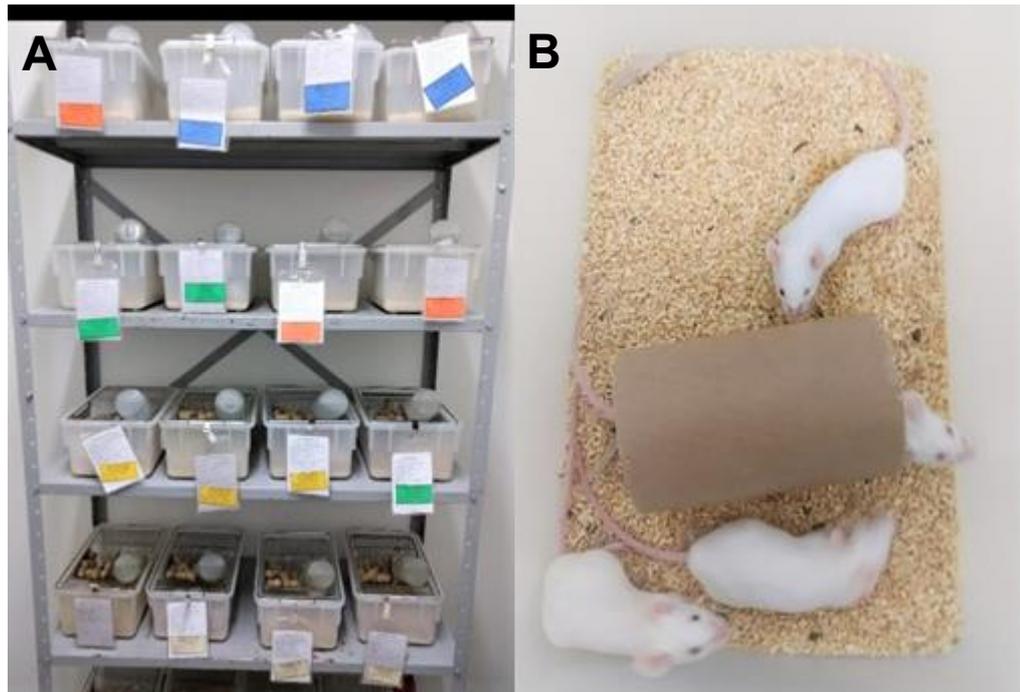
MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

A escolha do modelo animal levou em consideração os principais fatores que podem interferir no comportamento animal, como sexo e idade, além da suscetibilidade da linhagem do roedor à infecção pelo *T. gondii*. De acordo com o estudo conduzido por Sakuma (2009), as alterações hormonais do ciclo estral podem modificar o comportamento das fêmeas, sendo um fator de confundimento em estudos comportamentais. Da mesma forma, as mudanças fisiológicas relacionadas à idade do animal podem ter um grande impacto nas variáveis experimentais. Segundo Jackson et al. (2014), o desenvolvimento do sistema imunológico, foi demonstrado que as células B têm um fenótipo imaturo até a 4ª semana de vida, já as células T amadurecem por volta da 8ª semana. Além disso, a seleção correta da linhagem do modelo experimental é fundamental para o sucesso da infecção e sobrevivência dos animais. Subauste (2012) demonstrou que camundongos isogênicos BALB/c são mais adequados para estudos de infecção crônica por *T. gondii*, pois são mais resistentes à infecção pelo parasita se comparados aos animais isogênicos da linhagem C57Bl/6J. Por estas razões, optamos, em nosso estudo, pela utilização de camundongos isogênicos machos da linhagem BALB/c com oito semanas de idade (adultos).

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e permaneceram alojados no Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSC-SP), onde foram mantidos em gaiolas plásticas (5 animais / gaiola), contendo maravalha de pinho autoclavada e enriquecimento ambiental com rolo de papelão autoclavado (Fig.9 A, B). Todos os grupos experimentais receberam ração e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo CPE-IMT 000382A) (anexos 1 e 2) e todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.



Fonte: Fotografia Autoral.

Figura 9. Instalações do biotério de experimentação da FCMSC-SP. (A). Animais alojados em caixas plásticas mantidas em estante aberta. (B). Enriquecimento ambiental com rolos de papelão.

5.2 Parasitas

As suspensões de taquizoítos das cepas arquetípicas (ME 49 - tipo II e VEG - tipo III) e das cepas não arquetípicas (#175 e #318) foram obtidas de amostras criopreservadas em nitrogênio líquido (-196°C) do Biorrepositório do Laboratório de Protozoologia do IMT/FMUSP.

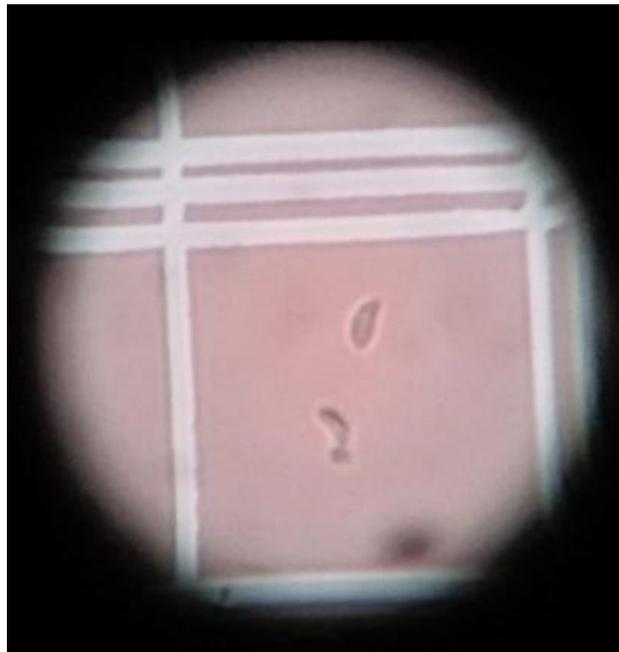
As amostras criopreservadas das cepas ME49 e VEG foram obtidas por meio de sucessivas passagens em camundongos C57Bl/6j knockout para IFN- γ . Essas cepas são mantidas, rotineiramente, pelo Lab. de Protozoologia do IMT/FMUSP e as suspensões parasitárias do lavado peritoneal dos animais infectados são estocadas em nitrogênio líquido.

As amostras criopreservadas das cepas #175 e #318 foram isoladas pelo Lab. de Protozoologia de casos graves de toxoplasmose congênita, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – HCFMUSP, em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMUSP. A cepa #175 foi isolada

de uma amostra de líquido amniótico e a cepa #318 foi obtida de um fragmento de placenta. Estudos de caracterização genética e biológica identificaram um perfil de alta virulência para essas duas cepas, demonstrando quadros graves e fatais em camundongos experimentalmente infectados (Meireles et al., 2022). Após isolamento, as cepas #175 e #318 foram mantidas por meio de 5 passagens sucessivas em camundongos Swiss não isogênicos e a suspensão parasitária do último lavado peritoneal foi estocada em nitrogênio líquido no Biorrepositório do Lab. de Protozoologia do IMT/FMUSP.

5.2. Preparação e quantificação de inóculos

Os modelos experimentais foram infectados com inóculos contendo 1000 taquizoítos de cada cepa de *T. gondii*, seguindo o protocolo preconizado por González et al. (2007). Para preparação dos inóculos, as amostras de taquizoítos mantidas em nitrogênio líquido foram descongeladas a temperatura ambiente e, em seguida, uma alíquota (10 μ L) de cada cepa foi examinada por microscopia óptica convencional (aumento de 40X) para quantificação do número de taquizoítos em câmara de Neubauer (Fig. 10). A suspensão final foi ajustada para um volume contendo 10^3 taquizoítos por inóculo.



Fonte: Fotografia Autoral.

Figura 10. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em câmara Neubauer, aumento de 40x.

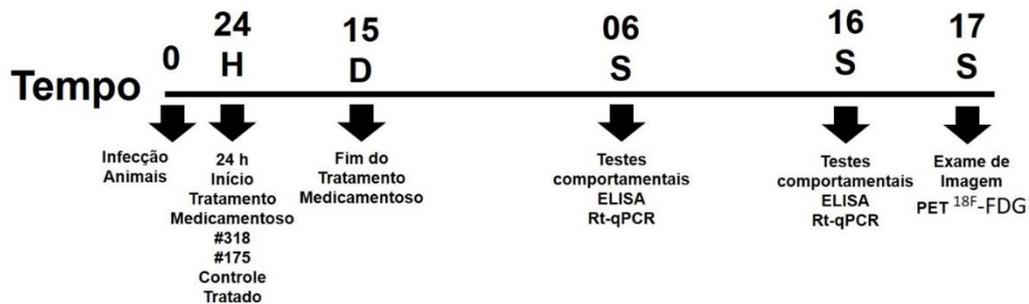
5.3. Delineamento experimental

Foram utilizados 90 camundongos BALB/c machos com 8 semanas de idade. Esses animais foram divididos em seis grupos experimentais, a saber: (i) Grupo controle, inoculado por via intraperitoneal com 0,1 mL de solução salina; (ii) Grupo Controle tratado, inoculado por via intraperitoneal com 0,1 mL de solução salina e tratado com Sulfadiazina (100 mg/kg) e Pirimetamina (20 mg/Kg), por via oral, durante um período de 15 dias; (iii) Grupo ME 49, inoculado por via intraperitoneal com 10^3 taquizoítos da cepa ME 49 (tipo II); (iv) Grupo VEG, inoculado por via intraperitoneal com 10^3 taquizoítos da cepa VEG (tipo III); (v) Grupo #175, inoculado por via intraperitoneal com 10^3 taquizoítos da cepa #175 e (vi) Grupo #318 inoculado por via intraperitoneal com 10^3 taquizoítos da cepa #318.

Devido à alta virulência das cepas #175 e #318, previamente, demonstrada por nosso grupo (Meireles et al., 2022), os animais dos grupos experimentais, infectados por estas cepas, foram tratados, após 24 horas da administração do inóculo, com Sulfadiazina (100 mg/kg) e Pirimetamina (20 mg/Kg), por via oral, durante um período de 15 dias de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2019). Esse tratamento foi instituído para permitir a sobrevivência dos animais durante a fase aguda da infecção, possibilitando a avaliação das alterações comportamentais e neurofisiológicas na fase crônica da infecção. O grupo controle tratado foi submetido aos mesmos procedimentos empregados aos demais grupos, visando avaliar uma possível interferência do tratamento medicamentoso no comportamento e no metabolismo da glicose cerebral. Para os animais dos grupos infectados pelas cepas VEG e ME49, este tratamento não foi necessário, já que essas cepas apresentam baixa virulência, permitindo a cronificação da infecção (Howe and Sibley, 1995).

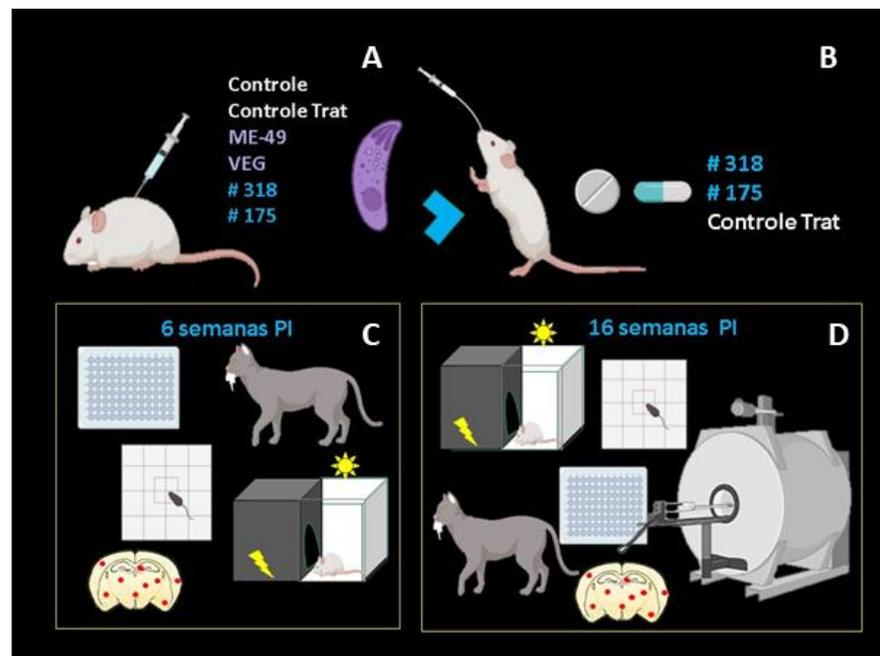
O período experimental teve uma duração de 17 semanas (Fig. 11), sendo que as avaliações dos parâmetros comportamentais foram realizadas em dois períodos distintos da infecção crônica (6ª e 16ª semanas). Na 17ª semana de infecção, seis animais, de cada grupo experimental, foram submetidos ao exame de imagem PET ^{18}F -FDG para avaliação do metabolismo da glicose cerebral. A quantificação dos parâmetros comportamentais foi determinada pela observação das filmagens individuais dos animais realizadas durante a execução dos testes. Após a realização da primeira bateria de testes, cinco animais, de cada grupo, foram eutanasiados para avaliação da resposta imune humoral e quantificação da carga parasitária cerebral e

os remanescentes foram eutanasiados ao término da segunda bateria de testes comportamentais, após o exame de imagem PET ^{18}F -FDG (Fig. 12). A eutanásia dos animais foi realizada pela administração intraperitoneal de tiopental (200 mg/Kg) associado com 10 mg/mL de lidocaína.



Fonte: Desenho autoral.

Figura 11. Linha do tempo do delineamento experimental. 24 H (24 horas após a inoculação dos grupos experimentais); 15 D (15 dias) de tratamento medicamentoso dos grupos #175, #318 e controle tratado; 06 S (seis semanas após inoculação); 16 S (seis semanas após inoculação); 17 S (dezessete semanas após inoculação).



Fonte: Desenho autoral realizado com imagens da plataforma Mind the Graph.

Figura 12. Ilustração do delineamento experimental. (A) Infecção dos grupos experimentais com 10^3 taquizoítos e inoculação de solução fisiológica nos grupos controles. (B) Tratamento dos grupos infectados pelas cepas #175 e #318 e do grupo controle tratado. (C). Representação dos eventos realizados na 6ª semana de infecção, incluindo sorologia para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*; quantificação da carga parasitária cerebral; teste de Campo Aberto; teste de Esquiva Inibitória e teste de preferência olfativa ao odor do felino. (D) Representação dos eventos realizados na 16ª semana de infecção (idênticos aos descritos na 6ª semana) e o exame de imagem PET- ^{18}F -FDG realizado na 17ª semana de infecção.

5.4. Testes comportamentais

Para facilitar o manejo e a identificação dos animais dentro de um mesmo grupo experimental, cada camundongo recebeu uma marcação com ácido pícrico diferente. Os parâmetros comportamentais foram avaliados em duas fases distintas (6^a e 16^a semanas de infecção), sendo utilizados os seguintes testes comportamentais: (i) Campo Aberto para avaliação da locomoção e atividade exploratória; (ii) Esquiva Inibitória para avaliação do medo condicionado e (iv) Labirinto em Y para avaliação do medo inato. Todos os testes foram realizados no Biotério da FCMSCSP, em salas específicas, devidamente equipadas para realização de ensaios comportamentais. Esses locais foram projetados com ante-sala para ambientação dos animais, e sistemas de isolamento acústico e controle de luminosidade. Todos os testes foram realizados no período matutino, após uma hora de ambientação dos animais na ante-sala (Fig.13).



Fonte: Fotografia Autoral.

Figura 13. Ambientação dos animais na ante-sala do biotério da FCMSCSP.

5.4.1. Teste de Esquiva Inibitória

O teste de Esquiva Inibitória foi empregado para avaliação do medo condicionado, utilizando como parâmetros a aprendizagem e a memória associadas a um estímulo ambiental aversivo (choque), que o animal aprende a evitar. Alguns estudos preconizam que tais parâmetros devem ser avaliados, levando-se em consideração, o período de latência, isto é, o tempo que o animal demora para entrar no ambiente aversivo (Berté, 2009; Albuquerque e Silva, 2009).

Os testes de Esquiva Inibitória foram realizados no equipamento Ugo Basile 7551 (Fig.14). Esse aparelho apresenta dois compartimentos, onde um é pouco iluminado e preferido pelo roedor, e o outro é bem iluminado (iluminação artificial). Esses compartimentos são separados por uma porta automatizada com abertura programada. A metodologia empregada para realização dos testes foi semelhante às descritas nos trabalhos de Wang et al. (2009) e Wang et al. (2011), com algumas modificações. O experimento foi dividido em três partes, a saber: (i) treinamento; (ii) teste realizado após 90 minutos do término do treino e (iii) teste realizado após 24 horas do treinamento. Cada uma das etapas teve um tempo de duração de 300s.

Tanto na fase de treinamento, como de execução dos testes, os animais foram colocados no compartimento iluminado do aparelho, com a cabeça voltada para a porta de acesso ao compartimento escuro e o equipamento foi programado para abrir a porta após 2s. Após a entrada do animal no compartimento escuro, o mesmo recebeu uma descarga elétrica de 2,5 mA por 2s nas patas (estímulo aversivo). Imediatamente após levar o choque, o animal foi retirado do aparato e levado para uma gaiola de descanso. Os animais que não entraram no compartimento escuro no decorrer do teste foram devolvidos para caixa de descanso. Antes de realizar o teste com um novo animal, o equipamento foi higienizado com etanol (5%) para evitar interferência do odor do animal anteriormente testado.



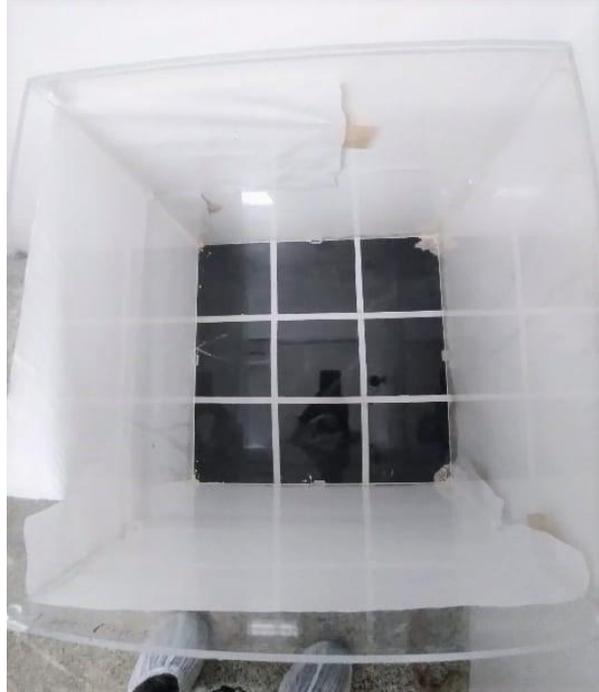
Fonte: Fotografia Autoral.

Fig. 14 Esquiva Inibitória. (A). Vista superior do equipamento, mostrando os compartimentos claro e escuro. (B) Imagem da tela de comando com os dados da programação do teste.

5.4.2. 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 desconhecido (Guizzo, 2009). As variáveis analisadas foram locomoção (número de vezes em que o animal cruzou um quadrante demarcado no piso do aparato), movimento vertical (número de vezes que o animal se manteve na posição vertical, apoiando-se nas patas traseiras), tempo de permanência na região central em relação à região periférica do equipamento, tempo de imobilidade e tempo gasto no comportamento de *grooming* (auto-limpeza). Além disso, ao final do teste, foram contabilizados os pellets fecais de cada animal.

O aparato utilizado era de acrílico com 51 x 49 x 49 cm de dimensão (Fig. 15). Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e tiveram 300s para explorar o ambiente. Os testes foram filmados e ao término de cada testagem, o equipamento foi higienizado com etanol 5%.



Fonte: Fotografia Autoral.

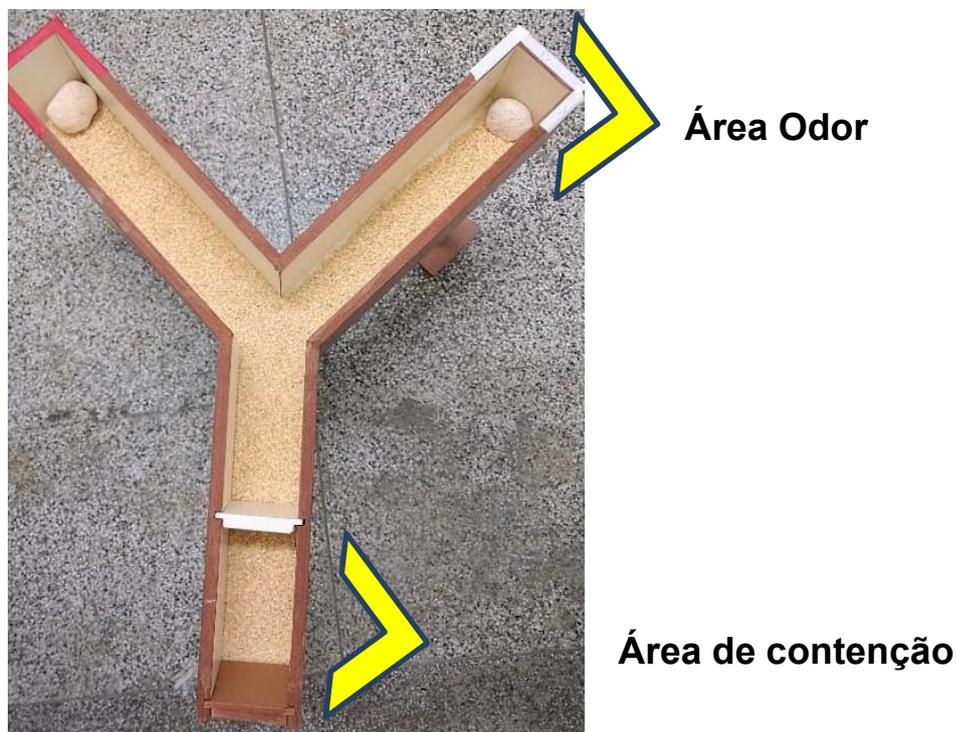
Figura 15. Vista superior do Campo Aberto, mostrando os quadrantes demarcados no piso do equipamento.

5.4.3. Teste de Labirinto em Y

Para avaliação do medo inato à exposição ao odor de felinos, foi utilizado o teste de Labirinto em Y, que consiste em uma plataforma de madeira com três braços dispostos em Y. Os braços do equipamento foram projetados com 35 cm de largura, 5 cm de espessura e altura das paredes de 10 cm, além de uma elevação de 31 cm do solo. Visando o conforto dos animais, optou-se por forrar o labirinto com uma camada de maravalha de pinho autoclavada que era trocada a cada testagem para realização da higienização do aparato com etanol (5%).

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 120s (Fig. 16) e após esse período liberado para exploração do equipamento por 300s, conforme metodologia preconizada por Kavaliers et al. (1994). A aversão dos animais ao odor do predador foi avaliada em dois testes independentes, sendo que no primeiro teste, foi utilizada urina pura de gato doméstico macho adulto, e no segundo, uma solução do aminoácido L-felinina, que é uma molécula presente na urina de felinos. Os experimentos seguiram a mesma metodologia do treinamento e para a adição dos

odores foram feitos saches de maravalha (1g) contendo 1mL de urina pura de gato, ou 1mL de solução contendo 0,05% de L-felinina (Toronto Research Chemicals[®]) como preconizado por Voznessenskaya (2014). Os testes foram realizados 24 horas após o treino, sendo que em um dos braços foi introduzido um sache com o odor do predador (urina ou L-felinina) e no braço oposto do aparelho foi colocado um sache contendo 1mL de solução salina (Fig.16). O tempo de permanência em cada região e o número de entradas em cada braço foram contabilizados. Além disso, foi registrado o primeiro braço de escolha de cada animal (Bramley e Waas, 2001; Kavaliers et al., 1994). Após a realização de cada teste, o aparato foi higienizado com álcool 5%. Todos os ensaios foram filmados com a utilização da câmera digital.



Fonte: Fotografia Autoral.

Figura 16. Vista superior do teste de Labirinto em Y, mostrando os saches com odor do predador (braço com marcação vermelha) e com odor neutro (braço com marcação branca) e a área de contenção do aparato.

Através da avaliação dessas variáveis foi realizado o cálculo de razão de preferência olfativa "*preference ratio*", baseado no modelo proposto por Kaushik e colaboradores (2014), no qual o tempo de permanência em (s) do animal no braço

com o odor do predador (Urina de gato ou L-felinina) foi dividido pelo tempo total do teste (Fig.17).

$$\frac{\text{Tempo de Permanência em (s):}}{\text{Braço com odor Felino (Urina ou L-Felinina)}} \times \frac{\text{300s}}{\text{300s}} = \text{“Preference Ratio”}$$

Fonte: Autoral.

Figura 17. Fórmula matemática para o cálculo de preferência olfativa dos animais durante o teste de Labirinto em Y.

5.5. Avaliação da Resposta Imune Humoral

Para confirmação da infecção parasitária e avaliação da resposta imune humoral dos animais, foi realizada a detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii* por ELISA. Brevemente, microplacas de poliestireno 96 poços (Sigma[®]) foram revestidas com 100µL/poço de solução contendo 10µg/ml de extrato antigênico de *T. gondii*, diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5. As placas foram incubadas a 4°C *overnight*, sendo lavadas, em seguida, com solução salina tamponada de fosfato (PBS) contendo 0,05 % de Tween 20 (PBST) e bloqueadas durante 1 hora a 37° C com PBST contendo 3 % de leite desnatado (PBSTL). Após essa etapa, foram realizadas 3 lavadas com PBSTL, e a seguir, foram adicionadas as amostras de soro na diluição 1:50 (100µL/poço) e as placas foram incubada durante 1 hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com PBST e foram adicionados 100µL/poço de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma[®]) na diluição de 1:5000 e as placas foram mantidas por mais 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 minutos, em câmara escura, seguida de bloqueio pela adição de HCl 4N. A leitura da absorbância de cada poço foi determinada a 492 nm em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS[®]). Em todas as reações foram utilizadas amostras de soro controle

positivo, obtidas de animais previamente infectados por *T. gondii* e amostras de soro controle negativo, provenientes de animais sem infecção pelo parasita.

5.6. Quantificação de parasitas cerebrais

5.6.1. Extração e purificação do DNA para qPCR

A quantificação da carga parasitária cerebral foi feita por qPCR após extração do DNA de amostras de tecido cerebral dos animais experimentais. A extração de DNA foi realizada com o kit comercial de extração QIAamp DNA, Qiagen® de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, sendo extraídos 180µL 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.

5.6.2. Quantificação de parasitas cerebrais de camundongos BALB/c por RT-qPCR

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 25µL, contendo 12,5 µL de SYBR Green Mix (Invitrogen®), 1µL de cada primer (sense: GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG) e (antisense: TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC) 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 quarenta ciclos de 15s a 95°C e 60°C por 1 minuto. 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*), isto é, o “sinal de fundo” da fluorescência gerada durante os ciclos iniciais da qPCR. Com base nesta “fluorescência de fundo”, pode-se detectar a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado, denominado CT (*threshold cycle*). O CT foi definido como o ciclo em que a fluorescência excede estatisticamente

o *mean baseline*, sendo proporcional ao acúmulo de DNA alvos presentes na amostra, representando a mesma quantidade de produtos amplificados presentes no tubo.

5.6.3. Determinação do limite de detecção

Para determinar o limite de detecção da reação de qPCR foi realizada uma curva padrão com 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.

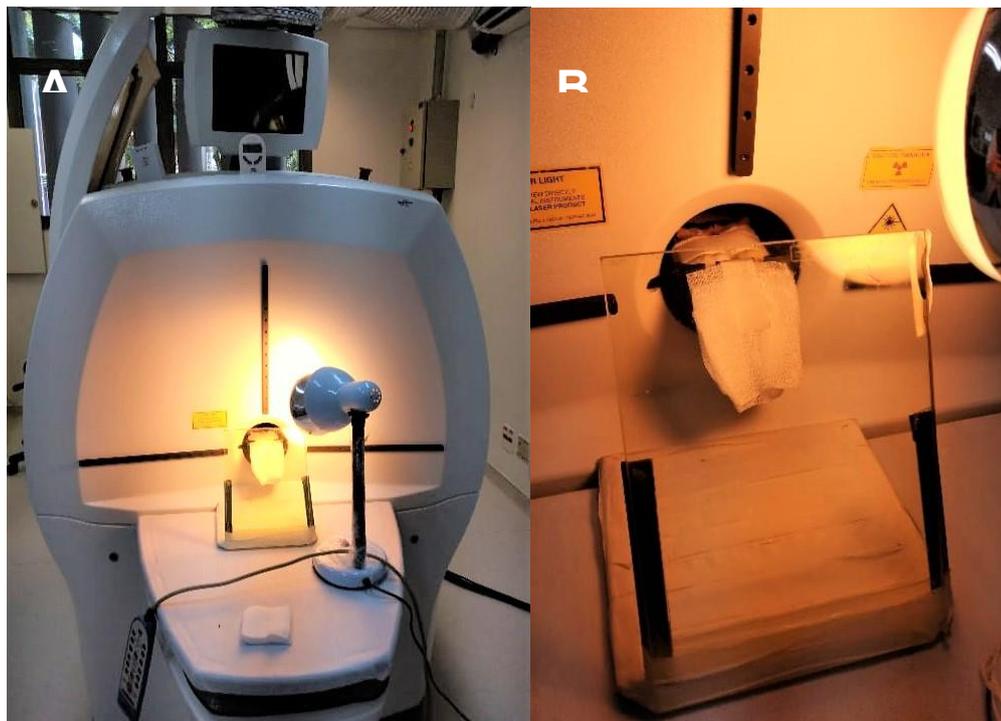
5.7. Exame de Imagem PET ^{18}F -FDG

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) com o radiofármaco ^{18}F -FDG é, atualmente, o método *in vivo* mais empregado para a investigação do metabolismo da glicose em diferentes regiões do cérebro humano, já que é um método de detecção não invasivo altamente sensível e quantitativo (Mosconi, 2013; Liguori et al., 2019). O desenvolvimento de um scanner PET em meados dos anos 2000, permitiu a aplicação do exame PET com alta resolução para pequenos animais, sobretudo, ratos e camundongos (Kornblum et al., 2000; Moore et al., 2000), fornecendo informações moleculares tridimensionais do cérebro de animais (Hosoi et al., 2005).

Em nosso estudo, as imagens PET utilizando ^{18}F -FDG foram adquiridas em um equipamento específico para pequenos animais (Triumph™ - Gamma Medica-Ideas, Northridge, CA, USA). Durante todos os procedimentos os animais (6 animais / grupo) permaneceram anestesiados por via inalatória (isoflurano 2 - 3% em oxigênio 100%) (Fig 18 A, B) e a glicemia destes animais foi verificada antes da administração do ^{18}F -FDG. O radiofármaco foi administrado por via endovenosa (veia peniana) na dose de 1 mCi (37 MBq). A aquisição das imagens foi iniciada 45 minutos após a administração do ^{18}F -FDG e cada aquisição teve duração de 30 minutos. As imagens foram reconstruídas com algoritmo OSEM, 20 iterações e 4 subsets.

As imagens PET foram analisadas no software PMOD™ (Switzerland) após correção com um template de ressonância magnética de camundongo (T2), disponível no software. Atlas de camundongo contendo regiões do cérebro (volumes de interesse - VOIs), também disponível no software, foi utilizado para análise. Para análise dos resultados as regiões encefálicas foram agrupadas em três grandes áreas: (i) *Forebrain*, constituído pelo telencéfalo e diencéfalo; (ii) *Midbrain* constituído pelo mesencéfalo e (iii) *Hindbrain* constituído pelo rombencéfalo (Ozumi- Yamashita et al., 1994). Os dados foram normalizados tendo como padrão o grupo controle e reportados como porcentagem de SUV (Standardized Uptake Value), que é a quantificação da concentração radioativa em determinado volume, corrigido pela dose injetada e massa corporal do animal.

Os dados do PET foram analisados de acordo com os seguintes critérios: (a) houve diferença na captação do radiofármaco entre os grupos experimentais? (b) houve diferença na captação do radiofármaco entre as três áreas avaliadas de um grupo experimental?



Fonte: Fotografia Autoral.

Figura 18. Imagem do exame PET 18F-FG. (A) Vista da frente do equipamento, mostrando os animais aquecidos por lâmpada incandescente. (B) Vista dos animais durante o exame.

5.8. Análise Estatística

A comparação dos valores individuais entre os grupos foi realizada por ANOVA com pós - teste de Bonferroni's. Na ausência de homogeneidade de variâncias foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com pós - teste de Dunn's. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparação entre frequências de eventos. Diferenças significativas foram consideradas quando a probabilidade de igualdade foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Em ensaios com medidas de resultados temporais foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. Para avaliação de dois ou mais fatores simultaneamente foi realizado o teste de Two-way- ANOVA. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 9.0.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Curva de sobrevivência

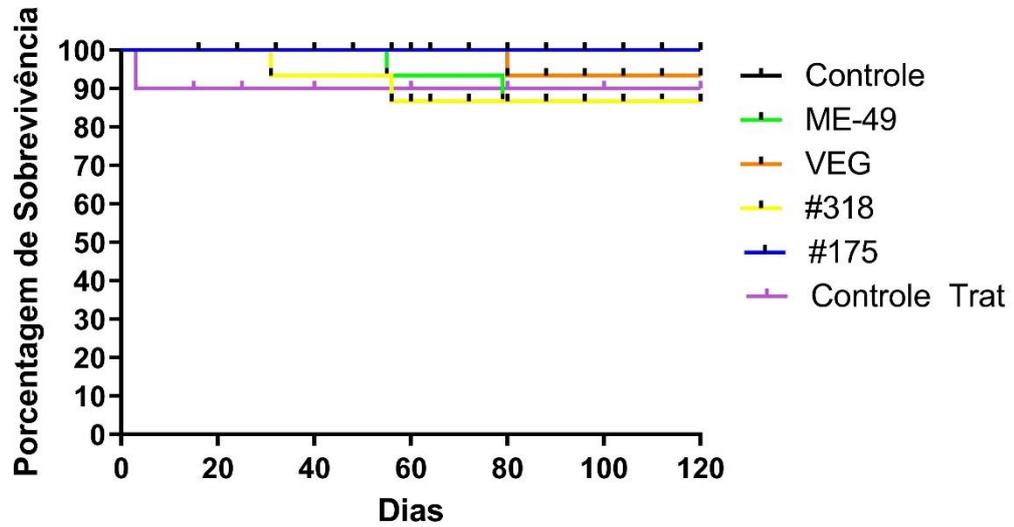


Figura 19. Curva de Sobrevivência dos grupos experimentais. Dados expressos com df: 5, $p=0.6680$ e Chi-quadrado=3.208 (Kaplan Meier).

Os dados da Fig.19 mostram que não houve diferença na porcentagem de sobrevivência dos animais para os diferentes grupos ao longo do período experimental ($p= 0. 6680$).

6.2 Pesagem dos Animais

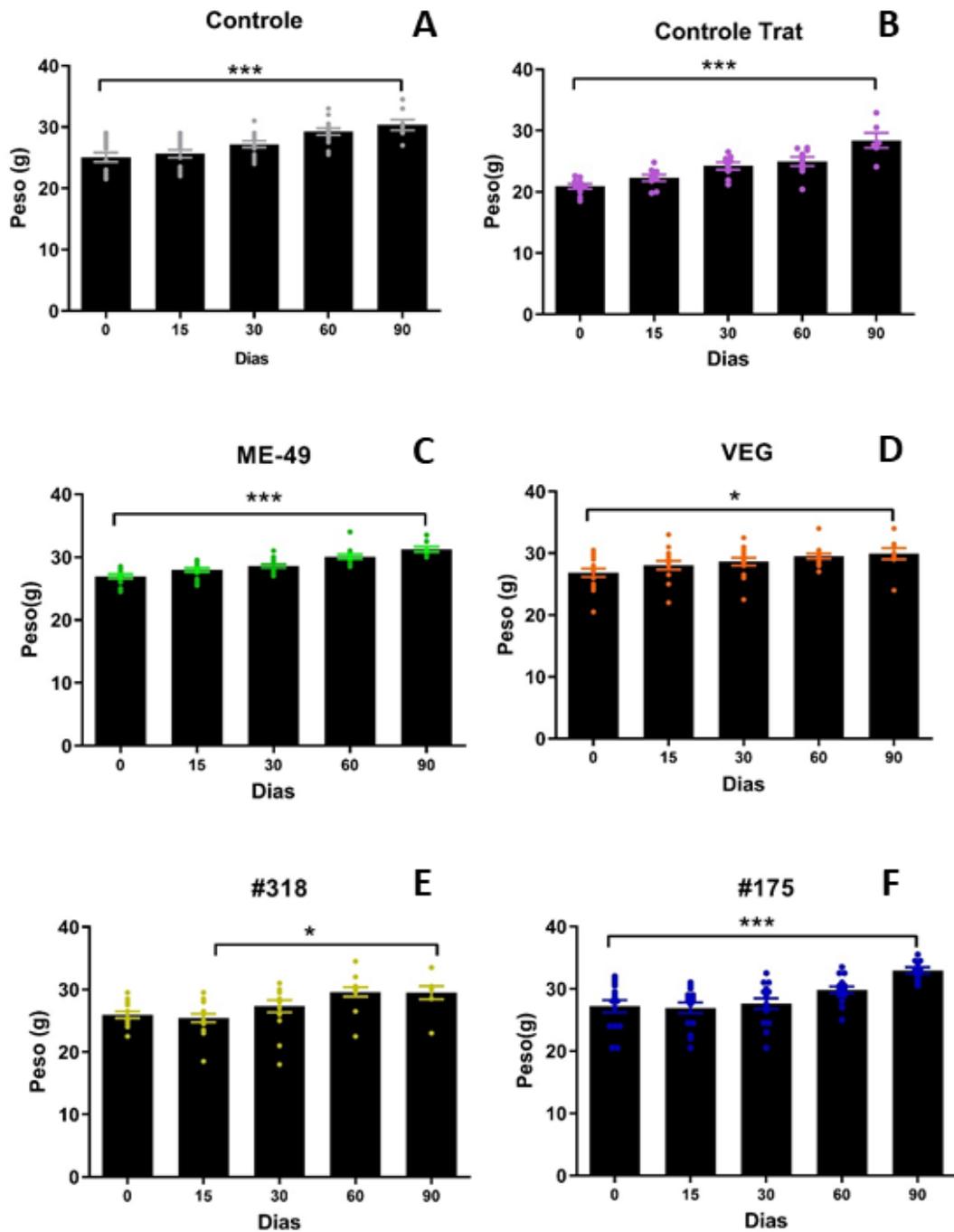


Figura 20. Peso em gramas (g) dos animais ao longo do período experimental. Dados expressos com média \pm SEM. A: Controle $F= 10.75$; $df= 69$; $***p<0.0001$. B: Controle Tratado, $F=4.38$; $df=42$; $***p<0.0001$. C: ME49, $F=21.16$; $df=66$; $***p<0.0001$. D: VEG, $F=3.362$; $df=68$; $*p<0.05$. E: #318, $F=5.596$; $df= 65$; $*p<0.05$. F: #175, $F=8.078$; $df=69$; $p<0.0001$. ANOVA, pós teste de Bonferroni.

A avaliação da evolução do peso corporal dos animais demonstrou que o grupo controle apresentou aumento do peso ao final de 90 dias de experimentação quando comparado ao período inicial da infecção ($p < 0,001$) (Fig. 20 A), acompanhado pelo grupo controle tratado ($p < 0,001$) (Fig. 20 B) e pelos grupos infectados com a cepa arquetípica ME49 ($p < 0,001$) (Fig. 20 C) e a cepa não arquetípica #175 ($p < 0,0001$) (Fig. 20 F). Os grupos infectados com a cepa arquetípica VEG ($p < 0,05$) (Fig. 20 D) e a cepa não arquetípica #318 ($p < 0,05$) (Fig. 20 E) demonstraram um ganho de peso menos significativo em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$). Estes dados mostraram que todos os grupos experimentais apresentaram aumento do peso corporal ao longo do período de experimentação.

6.3 Avaliação da resposta imune humoral por ELISA, detecção de anticorpos totais.

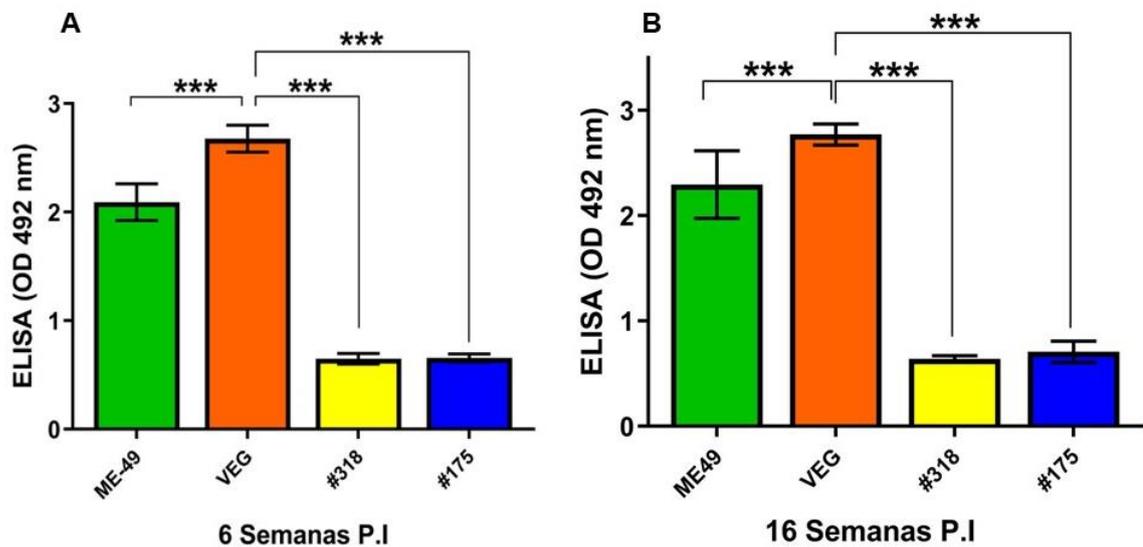


Figura 21. Resultados da detecção de anticorpos IgG anti - *T. gondii* por ELISA nos dois períodos experimentais. Dados expressos com média \pm SEM. A). Resposta imune humoral com seis semanas P.I., $F = 668.8$; $df = 23$; $***p < 0.0001$, (ME-49 N = 4; VEG N = 5; #318 N = 5; #175 N = 5) B). Resposta Imune Humoral com 16 semanas P.I., $F = 494.5$; $df = 41$; $***p < 0.0001$, (ME-49 N = 7; VEG N = 7; #318 N = 8; 175 N = 10). ANOVA, pós teste de Bonferroni.

Para avaliação da resposta imune humoral induzida pela infecção por diferentes cepas de *T. gondii* foi realizado o teste de ELISA com extrato proteico solúvel de *T. gondii* para a detecção de anticorpos IgG contra o parasita em dois períodos distintos de infecção (seis e dezesseis semanas). A Fig. 21A e a Fig. 21B mostram que a infecção pela cepa arquetípica VEG induziu maior resposta imune

humoral ($p < 0.0001$) quando comparada com as demais cepas nos dois períodos avaliados. Os resultados do ELISA demonstraram que as cepas arquetípicas (ME49 e VEG) foram capazes de induzir maior resposta imune humoral no hospedeiro do que as cepas não arquetípicas (#175 e #318).

6.4 Quantificação da carga parasitária cerebral por qPCR em Tempo Real

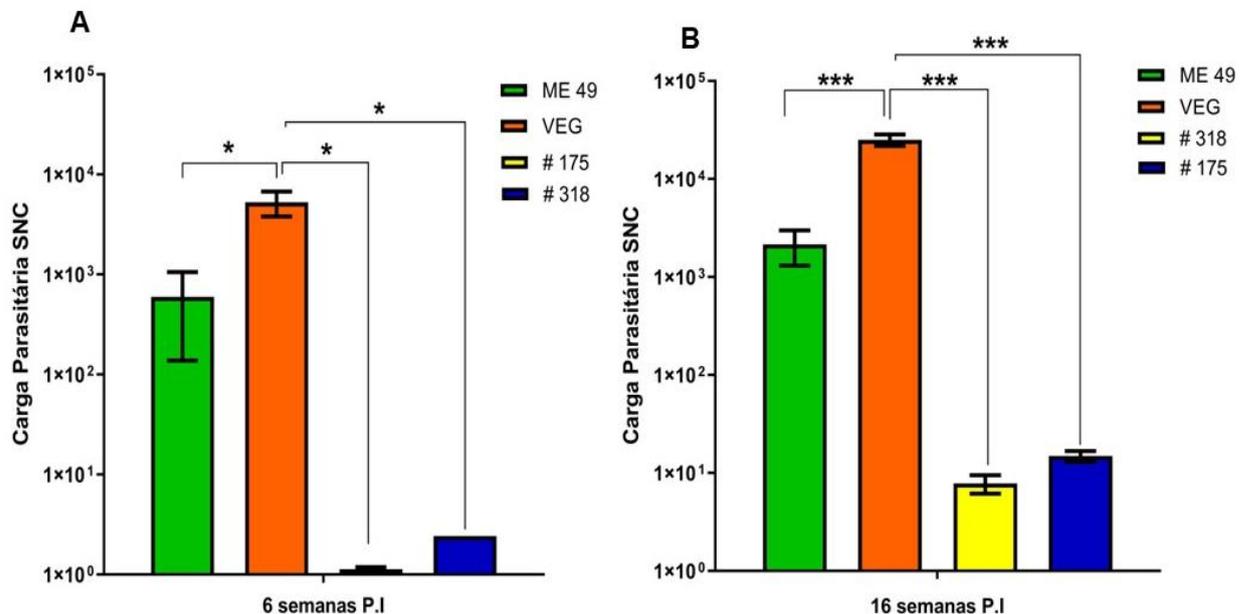


Figura 22. Resultados da detecção da carga parasitária de *T. gondii* no SNC nos dois períodos experimentais. Dados expressos com média \pm SEM. A) Carga parasitária cerebral com seis semanas P.I., $F = 9.274$; $df = 10$; $*p < 0.05$, (ME-49 $N = 3$; VEG $N = 3$; #318 $N = 3$; #175 $N = 3$). B) Carga parasitária cerebral com 16 semanas P.I., $F = 49.24$; $df = 11$; $***p < 0.0001$, (ME-49 $N = 3$; VEG $N = 3$; #318 $N = 3$; #175 $N = 3$). ANOVA, pós teste de Bonferroni.

A carga parasitária cerebral de cada cepa foi avaliada por qPCR em dois períodos distintos de infecção (seis e dezesseis semanas). Como podemos observar na Fig. 22A e na Fig. 22B, a infecção pela cepa arquetípica VEG apresentou maior carga parasitária cerebral quando comparada com as infecções causadas pelas demais cepas nos dois períodos avaliados. Além disso, foi possível notar que as infecções pelas cepas arquetípicas (ME49 e VEG) apresentaram maior carga parasitária cerebral quando comparadas com as infecções pelas cepas não arquetípicas (#175 e #318).

6.5 Avaliação da atividade locomotora e exploratória pelo teste de Campo Aberto.

6.5.1 Resultados do teste de Campo Aberto com seis semanas de infecção

O primeiro parâmetro avaliado no teste de Campo Aberto foi o tempo de imobilidade dos animais no aparato. Como podemos observar na Fig. 23, os animais infectados pela cepa arquetípica VEG apresentaram maior tempo de imobilidade em comparação com o grupos controle e ME49 ($p < 0.001$) e o grupo controle tratado ($p < 0.05$). Da mesma forma, os animais infectados com a cepa não arquetípica (#175) apresentaram maior imobilidade em comparação com os grupos controle e ME49 ($p < 0.001$) e o grupo controle tratado ($p < 0.05$).

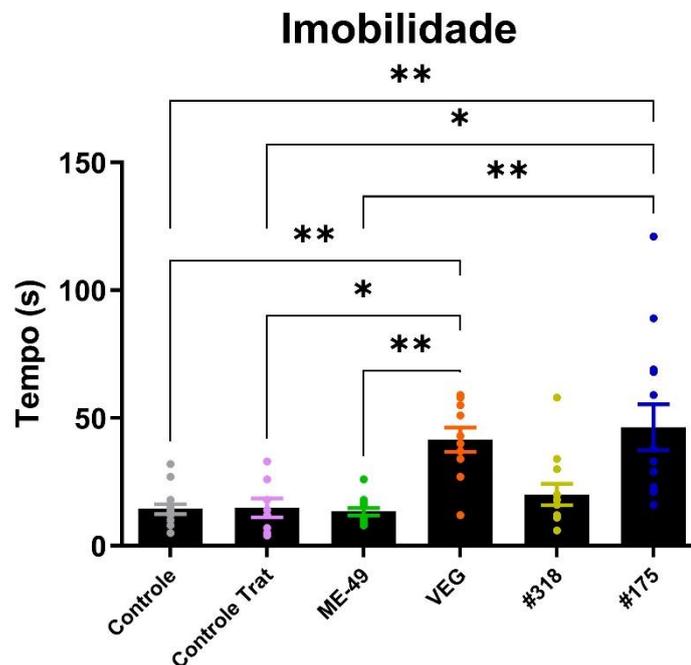


Figura 23. Tempo de imobilidade no teste de Campo Aberto com seis semanas de infecção. Dados expressos com média \pm SD; $F = 8.989$, $df = 69$, $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, (Controle $N=14$; Controle Tratado $N= 8$; ME-49 $N=13$; VEG $N=10$; #318 $N= 12$; #175 $N=13$). ANOVA. Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn.

O segundo parâmetro avaliado foi o tempo de permanência dos animais na área central do aparato. A Fig. 24 mostra que o grupo infectado pela cepa não arquetípica (#175) permaneceu por menos tempo na área central do equipamento em comparação com os grupos controle e controle tratado ($p < 0.05$), indicando que os

animais infectados por essa cepa exploraram mais a região periférica do aparato durante o teste.

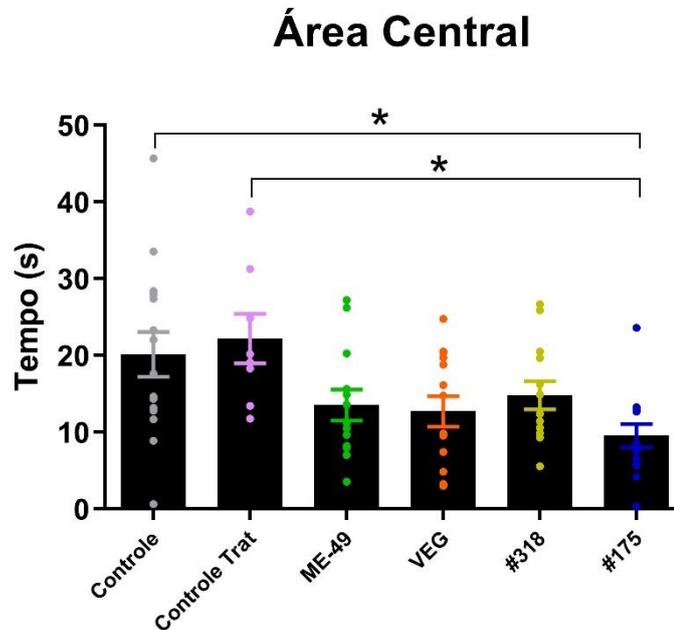


Figura 24. Tempo de permanência na área central do Campo Aberto com seis semanas pós-infecção. Dados expressos com média \pm SD; $F = 4.061$, $df = 76$, $* p < 0.05$. (Controle $N=15$; Controle Tratado $N= 8$; ME-49 $N=13$; VEG $N=14$; #318 $N= 13$; #175 $N=14$). ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

O terceiro parâmetro avaliado pelo teste de Campo aberto foi a locomoção, que consiste no número de movimentos horizontais e verticais realizados pelos animais no aparato. Os movimentos horizontais eram registrados sempre que o animal cruzava um quadrante demarcado no piso do aparato. Já, os movimentos horizontais eram computados sempre que o animal permanecia na posição vertical, isto é, apoiado somente pelas patas traseiras.

Como podemos observar na Fig. 25A, a quantidade de movimentos horizontais registrada no grupo infectado pela cepa arquetípica VEG foi menor que a computada no grupo controle ($p < 0.05$). Da mesma forma, o número de movimentos verticais registrado no grupo infectado pela cepa arquetípica VEG foi inferior aos registrados nos grupos controle ($p < 0.05$), controle tratado ($p < 0.05$) e ME49 ($p < 0.001$) (Fig.25 B).

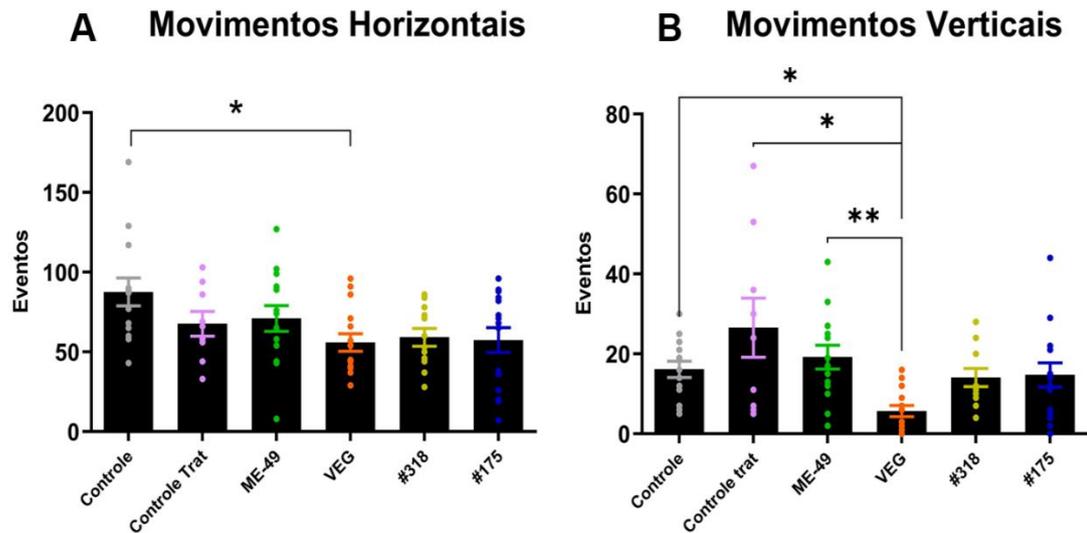


Figura 25. Dados de locomoção e exploração vertical dos grupos experimentais no teste de Campo Aberto com seis semanas pós-infecção. A) Movimentos horizontais, dados expressos com média \pm SD; $F = 2.800$, $df = 78$, $*p < 0.05$. ANOVA, pós teste de Bonferroni, (Controle $N=14$; Controle Tratado $N= 9$; ME-49 $N=14$; VEG $N=15$; #318 $N= 12$; #175 $N=15$). B) Movimentos verticais, dados expressos com média \pm SD; $F = 4.168$, $df = 77$, $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, (Controle $N=14$; Controle Tratado $N= 8$; ME-49 $N=14$; VEG $N=14$; #318 $N= 12$; #175 $N=15$). ANOVA. Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn.

Os últimos parâmetros avaliados pelo teste de Campo Aberto foram a quantidade de *pellets* fecais eliminada por cada animal durante o teste e o tempo empregado para a realização do *grooming* (autolimpeza). Como podemos observar na Fig. 25 não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais para esses dois parâmetros (Fig. 26 A e B).

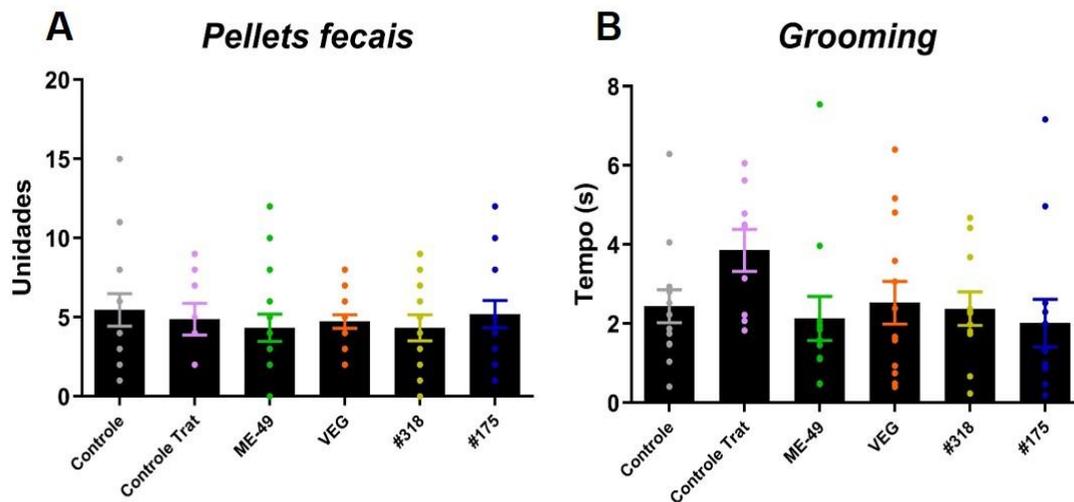


Figura 26. Avaliação da quantidade de *pellets* fecais e tempo de *grooming* no teste de Campo Aberto com seis semanas pós-infecção. A) Quantidade de *pellets* fecais por grupo experimental, dados expressos com média \pm SD; $F = 0.3158$, $df = 82$, $p < 0.90$., (Controle N=15; Controle Tratado N= 8; ME-49 N=15; VEG N=15; #318 N= 15; #175 N=15). ANOVA, pós test Bonferroni. B) Tempo empregado por cada grupo experimental para realização do *grooming*, dados expressos com média \pm SD; $F = 5.64$, $df = 69$, $p < 0.92$, (Controle N=13; Controle Tratado N= 9; ME-49 N=12; VEG N=13; #318 N= 11; #175 N=12). ANOVA, pós teste de Bonferroni.

6.5.2. Resultados do teste de Campo Aberto com dezesseis semanas de infecção

Na Fig. 27 estão apresentados os resultados do teste de Campo Aberto realizado na 16ª semana de infecção. Como podemos observar, o grupo infectado pela cepa arquetípica VEG apresentou maior tempo de imobilidade em relação aos grupos controle e controle tratado ($p < 0.0001$) e, também, em relação aos grupos infectados com a cepa arquetípica ME49 ($p < 0.001$) e a cepa não arquetípica #318 ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística significativa entre o grupo infectado pela cepa VEG e o grupo infectado pela cepa #175.

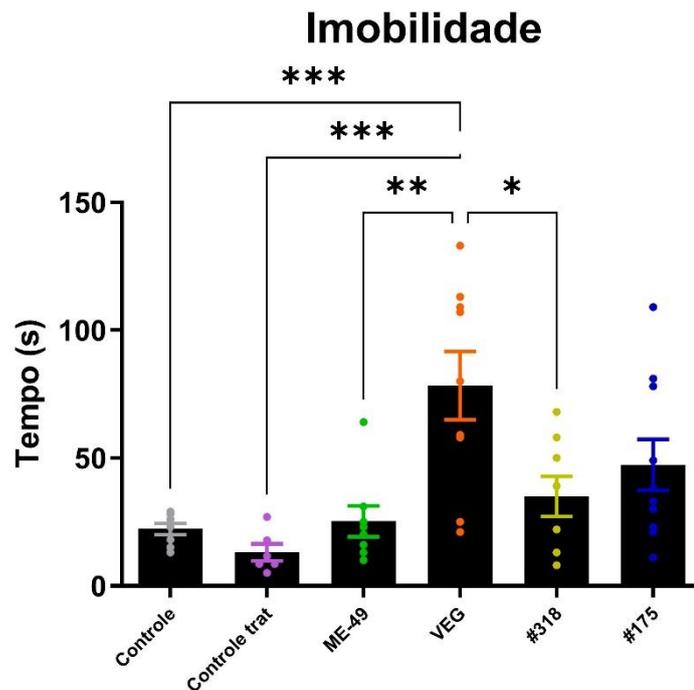


Figura 27. Tempo de imobilidade observado no teste de Campo aberto com dezesseis semanas pós-infecção. Dados expressos com média \pm SD; $F = 6.919$, $df = 48$, $*p < 0.05$, $**p < 0.001$ e $***p < 0.0001$, (Controle $N=8$; Controle Tratado $N=6$; ME-49 $N=8$; VEG $N=9$; #318 $N= 8$ #175 $N=10$). ANOVA, pós teste de Bonferroni.

Com relação ao tempo de permanência na área central do aparato, é possível notar que os animais infectados pela cepa arquetípica VEG permaneceram um tempo maior nessa área do aparato quando comparados com os animais do grupo controle ($p < 0.05$) e dos grupos controle tratado, ME49, #318 e #175 ($p < 0.001$) (Fig.28).

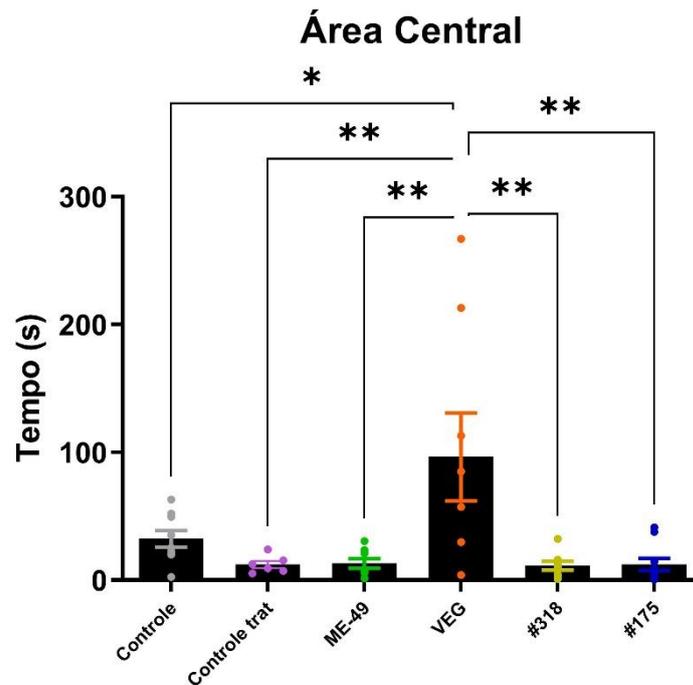


Figura 28. Tempo de permanência na área central do Campo Aberto com dezesseis semanas pós-infecção. Dados expressos com média \pm SD; $F = 5.363$, $df = 48$, $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, (Controle $N=9$; Controle Tratado $N= 6$; ME-49 $N=8$; VEG $N=8$; #318 $N= 8$; #175 $N=10$). ANOVA, pós teste de Bonferroni.

A avaliação da locomoção dos animais no teste de Campo Aberto realizado na 16ª semana pós-infecção, demonstrou uma redução dos movimentos horizontais dos animais infectados pela cepa arquetípica VEG em comparação com os demais grupos ($p < 0.05$), sobretudo, com o grupo controle tratado ($p < 0.001$) (Fig. 29 A). Em relação aos movimentos verticais, não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Fig. 29 B).

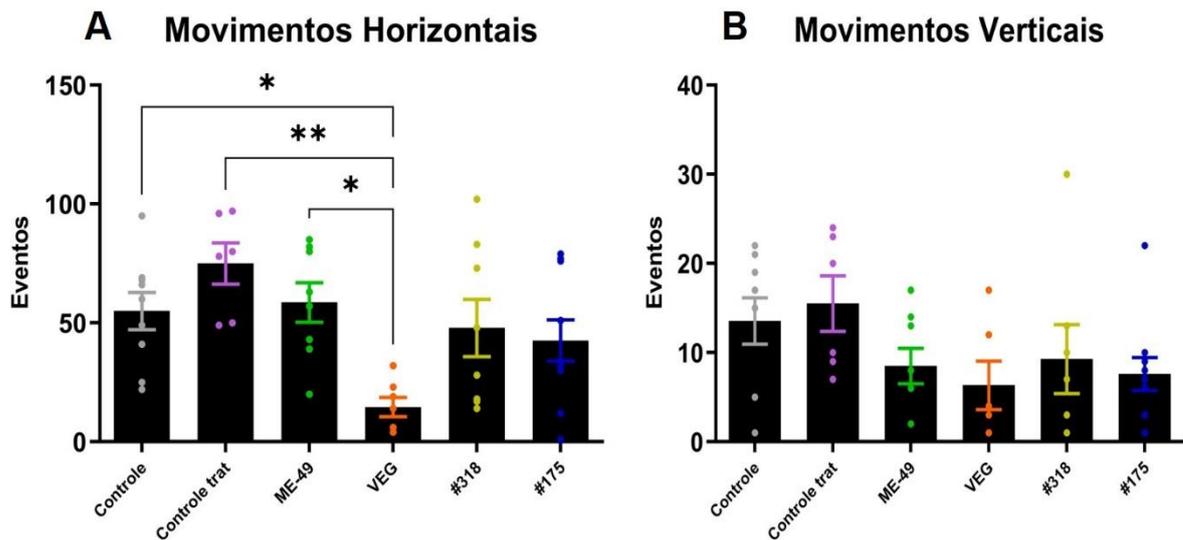


Figura 29. Dados de locomoção dos grupos experimentais no teste de Campo Aberto com dezesseis semanas pós-infecção. A) Movimentos horizontais, dados expressos com média \pm SD; $F = 4.451$, $df = 47$, $*p < 0.05$ e $**p < 0.001$, (Controle $N=9$; Controle Tratado $N= 6$; ME-49 $N=8$; VEG $N=7$; #318 $N= 8$; #175 $N=10$). B) Movimentos verticais, dados expressos com média \pm SD; $F = 1.694$, $df = 45$, $p=0.15$, (Controle $N=9$; Controle Tratado $N= 6$; ME-49 $N=8$; VEG $N=7$; #318 $N= 7$; #175 $N=10$). ANOVA, pós teste de Bonferroni.

Como podemos observar na Fig.30 não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais em relação à quantidade de *pellets* fecais e o tempo empregado para o comportamento de *grooming* no teste realizado na 16ª semana. (Fig. 29).

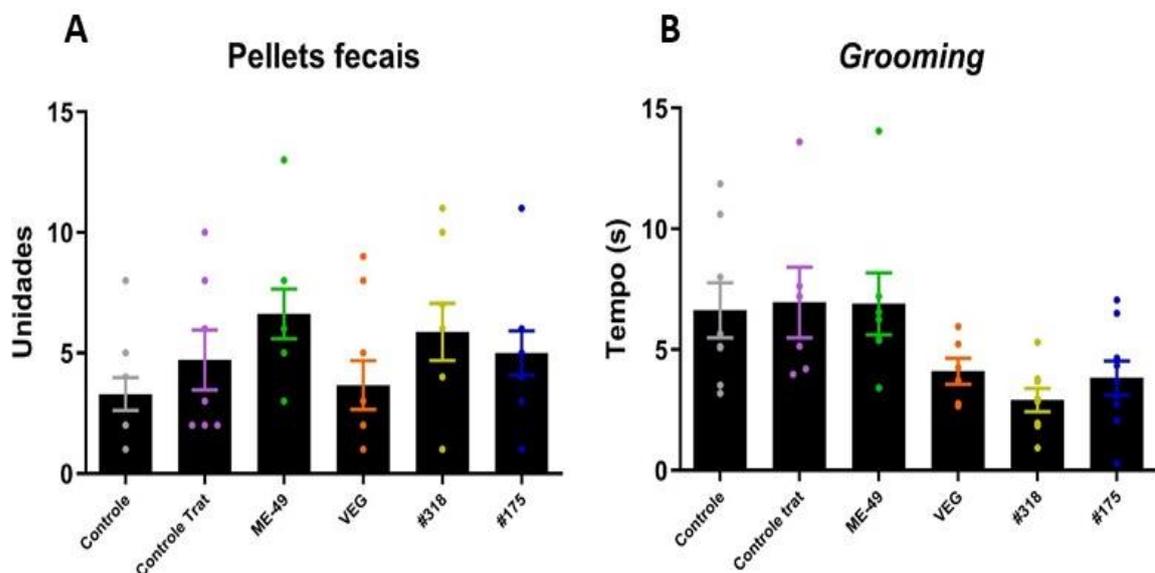


Figura 30. Avaliação da quantidade de *pellets* fecais e tempo de *grooming* no teste de Campo Aberto com dezesseis semanas pós-infecção. A). Quantidade de *pellets* fecais por grupo

experimental. Dados expressos com média \pm SD; $F = 0.41$, $df = 50$, $p = 0.83$, (Controle N=10; Controle Tratado N= 7; ME-49 N=8; VEG N=9; #318 N= 8; #175 N=9). B). Tempo empregado por cada grupo experimental para realização do comportamento de *grooming*, dados expressos com média \pm SD; $F = 3.497$, $df = 43$, $p = 0.01$, (Controle N=8; Controle Tratado N= 6; ME-49 N=7; VEG N=6; #318 N= 8; #175 N=9). ANOVA, pós teste de Bonferroni.

6.6. Avaliação da aprendizagem e memória condicionada pelo teste de Esquiva Inibitória

Os parâmetros cognitivos relacionados à aprendizagem e memória condicionada foram avaliados com base na latência de entrada dos animais no ambiente aversivo do aparato. A Fig. 31 apresenta os dados referentes às latências de cada grupo experimental nas diversas etapas do teste de Esquiva Inibitória (treino, teste realizado após 90 minutos do treino e teste realizado após 24 horas do treino). Como podemos observar na Fig.31, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, indicando que os animais não apresentaram alterações cognitivas referentes à capacidade de aprendizagem e consolidação das memórias de curto e longo prazo durante o período experimental.

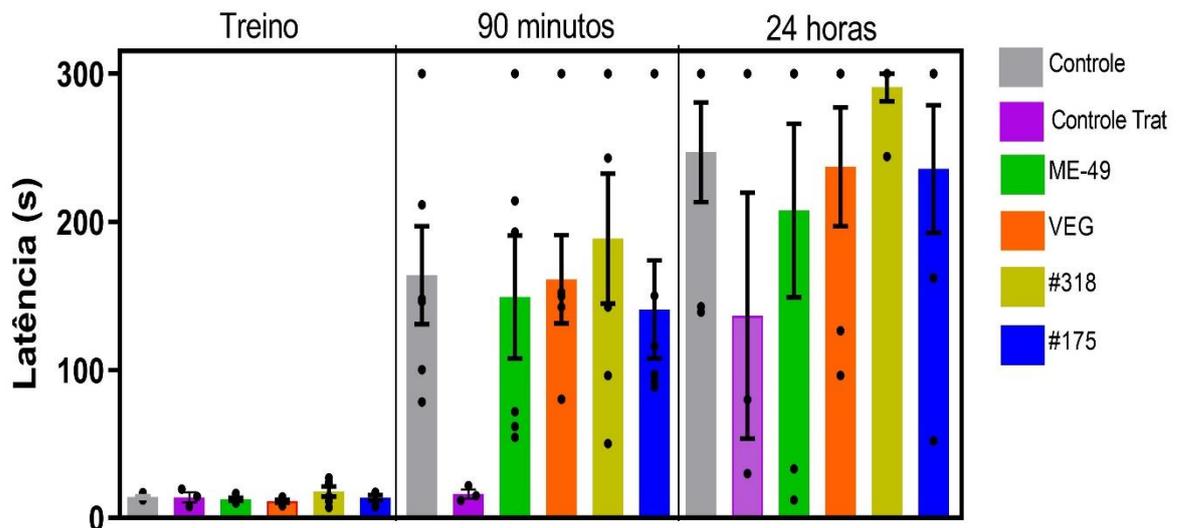


Figura. 31. Resultados do teste de Esquiva Inibitória, referente à latência de entrada dos animais no ambiente aversivo/escuro. Dados do treino, teste realizado após noventa minutos, teste realizado após vinte e quatro horas, (Controle N=8; Controle Tratado N= 3; ME-49 N=8; VEG N=8; #318 N= 8; #175 N=8). ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

6.7 Avaliação da aversão ao odor felino pelo teste de Labirinto em Y

6.7.1 Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 6 semanas de infecção utilizando urina de gato

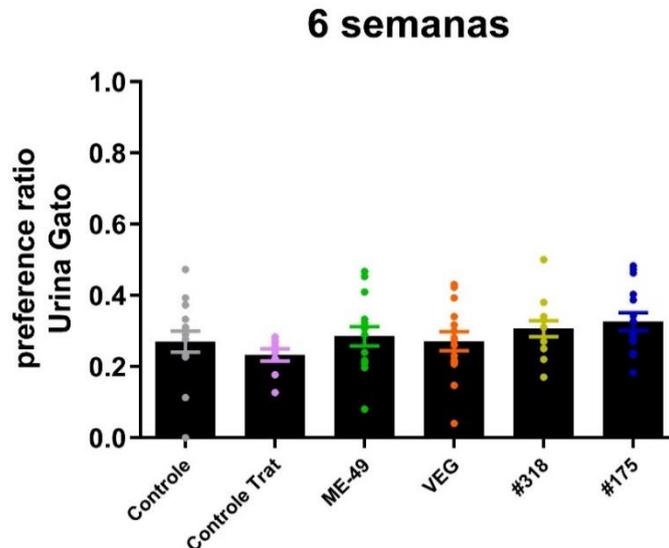


Figura 32. Resultados do cálculo da razão da preferência olfativa pela urina de gato, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com seis semanas pós-infecção, (Controle N=9; Controle Tratado N= 8; ME-49 N=9; VEG N=9; #318 N= 9; #175 N=9). Dados expressos com média \pm SD; $F = 1.304$, $df = 81$, $p > 0.05$. ANOVA, pós teste de Bonferroni.

O teste de Labirinto em Y foi realizado na 6^a e 16^a semanas de infecção, utilizando urina de gato macho adulto, para avaliação da preferência olfativa dos animais pelo odor do predador. A Fig.32 apresenta os resultados do cálculo da razão da preferência olfativa pela urina de gato no teste realizado na 6^a semana de infecção, mostrando que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Estes achados foram corroborados pelos resultados da porcentagem do tempo de permanência dos animais nas diferentes áreas do Labirinto em Y (braço sem odor, braço contendo 0,1 ml de urina de gato e área neutra), já que não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos (Fig. 33).

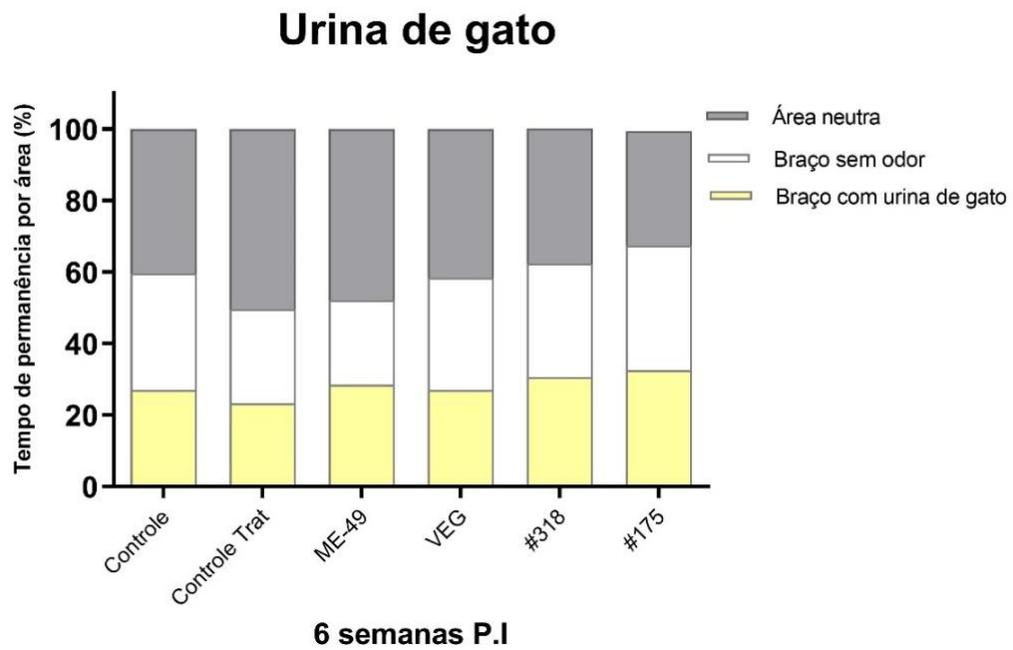


Figura 33. Porcentagem do tempo de permanência de cada grupo experimental nas três regiões do Labirinto em Y realizado com seis semanas de infecção, utilizando urina de gato. Dados expressos em porcentagem (%). Two-way ANOVA.

6.7.2 Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 16 semanas de infecção utilizando urina de gato

No segundo teste de Labirinto em Y, realizado na 16^a semana de infecção, os animais foram, novamente, expostos à urina de gato macho adulto. Nessa fase da infecção, foi observada uma preferência olfativa pelo odor do felino no grupo infectado pela cepa não arquetípica #318 quando comparado aos grupos controle e controle tratado ($p < 0.05$) (Fig. 34).

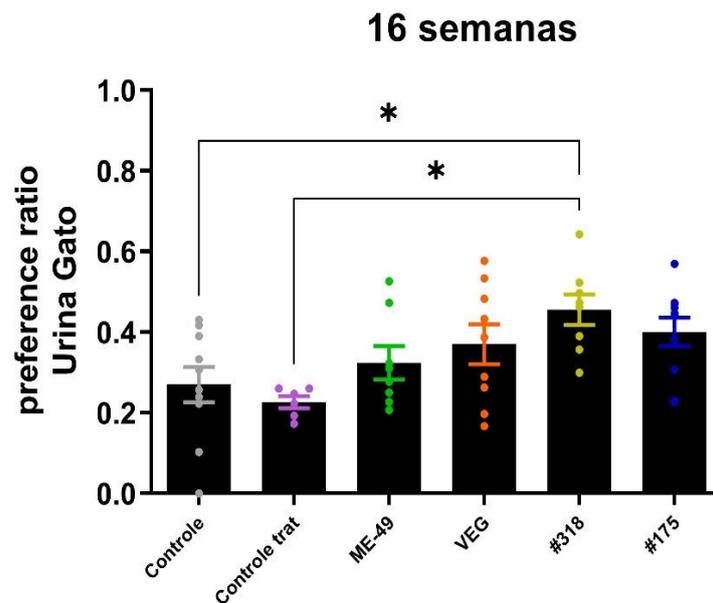


Figura 34. Resultados do cálculo da razão de preferência olfativa referente a urina de gato, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com dezesseis semanas de infecção, (Controle N=10; Controle Tratado N= 6; ME-49 N=8; VEG N=9; #318 N= 8; #175 N=8). Dados expressos com média \pm SD; $F = 3.915$, $df = 50$, $*p < 0.05$. ANOVA, pós teste de Bonferroni.

Os animais infectados pela cepa não arquetípica #318 permaneceram por maior tempo na área contendo a urina de gato em comparação com o braço sem odor ($p < 0.05$) e com a área neutra ($p < 0.001$) (Fig.35).

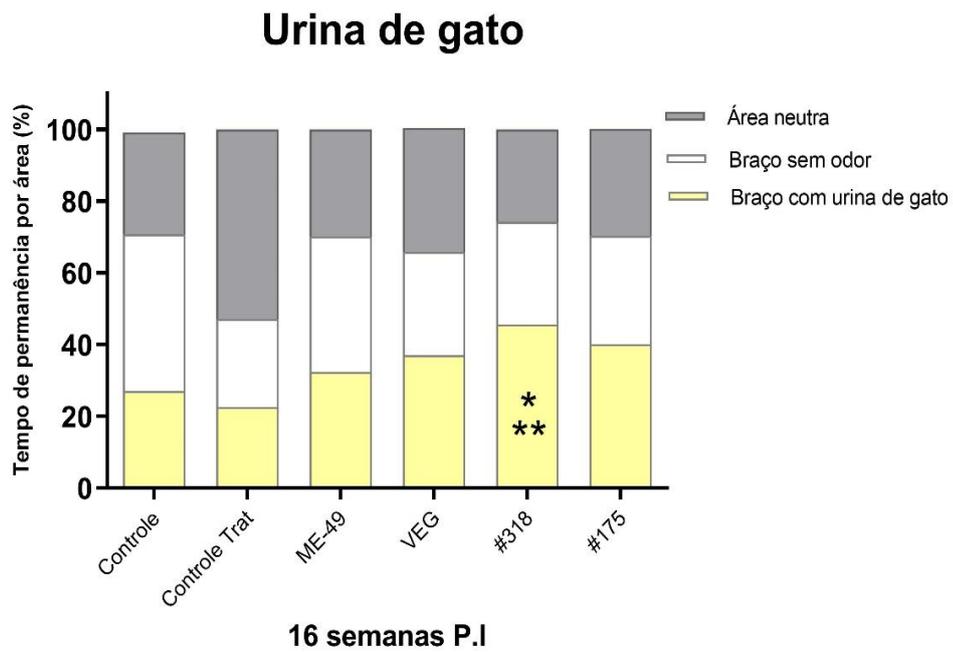


Figura 35. Porcentagem do tempo de permanência de cada grupo experimental nas três regiões do Labirinto em Y realizado com dezesseis semanas de infecção, utilizando urina de gato. Dados expressos em porcentagem (%), *p<0.05 e **p<0.001. Two-way ANOVA.

6.7.3 Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 6 semanas de infecção utilizando L-Felinina

Em relação à preferência olfativa pelo odor do aminoácido L-Felinina, o teste de Labirinto em Y, realizado com seis semanas de infecção, mostrou que o grupo infectado pela cepa não arquetípica (#175) apresentou uma preferência maior pelo odor desse aminoácido quando comparado com o grupo controle tratado ($p < 0.05$) (Fig.36). Esse dado foi confirmado pela maior porcentagem de tempo de permanência desse grupo no braço contendo L-Felinina em comparação com o braço sem odor ($p < 0.05$) e a área neutra ($p < 0.05$) do aparato (Fig.37).

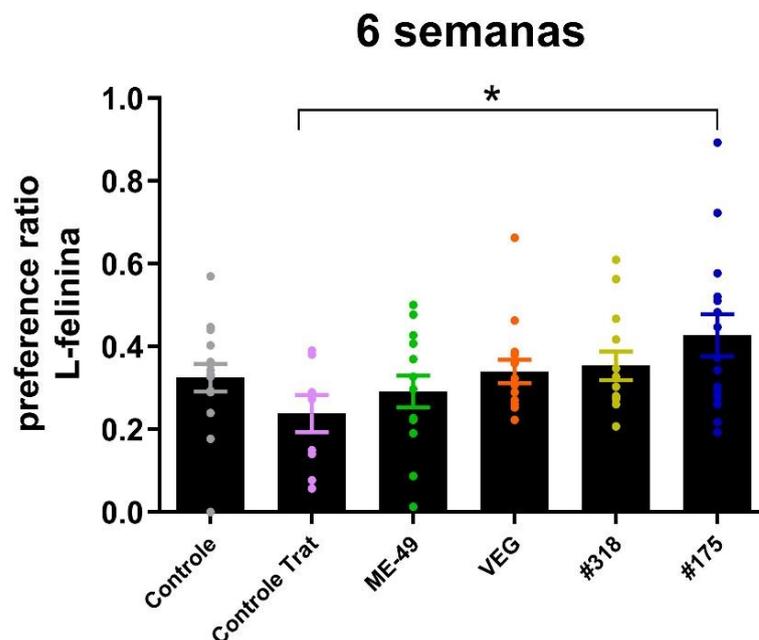


Figura 36. Resultados do cálculo da razão de preferência olfativa referente ao amino ácido L-Felinina, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com seis semanas de infecção, (Controle N=11; Controle Tratado N= 8; ME-49 N=10; VEG N=9; #318 N= 10; #175 N=14) Dados expressos com média \pm SD; F = 2.374, df = 81, * $p < 0.05$. ANOVA, pós teste de Bonferroni.

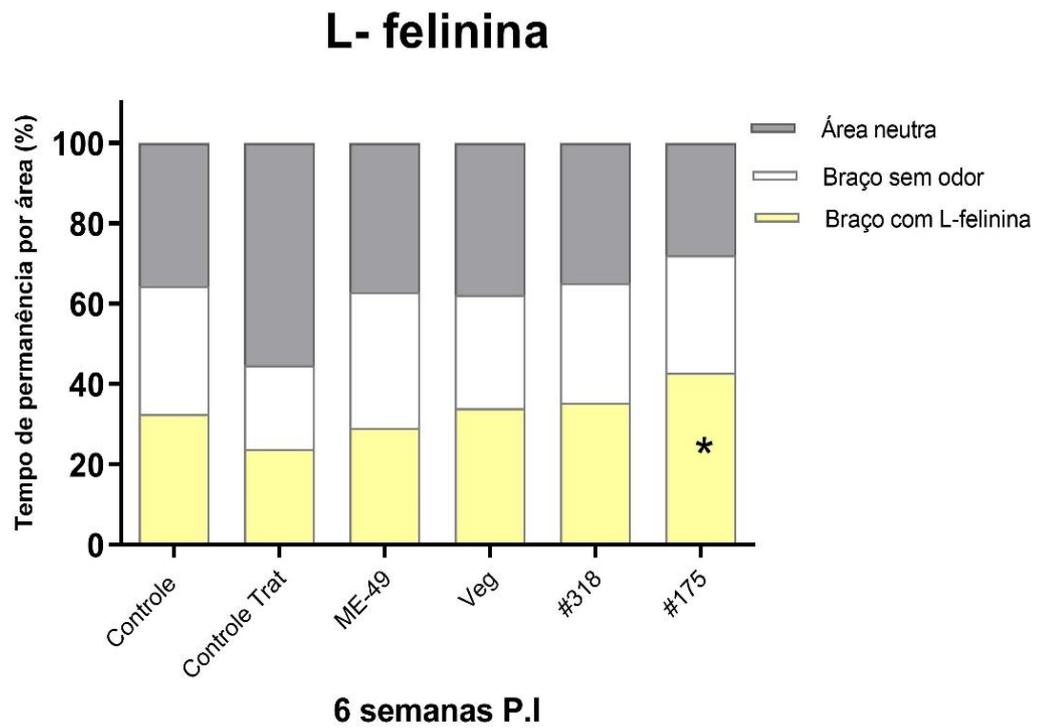


Figura 37. Porcentagem do tempo de permanência nas três regiões do Labirinto em Y em relação a avaliação da L-Felinina. Resultados obtidos do teste realizado com seis semanas de infecção. Dados expressos em porcentagem (%), * $p < 0.05$. Two-way ANOVA.

6.7.4 Resultado do teste de Labirinto em Y realizado com 16 semanas de infecção utilizando L-Felinina

O teste de Labirinto em Y, realizado com 16 semanas de infecção, demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais em relação à preferência olfativa pela L-Felinina (Fig.38). Da mesma forma, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos em relação à porcentagem do tempo de permanência dos animais nas diferentes áreas do aparato (Fig.39).

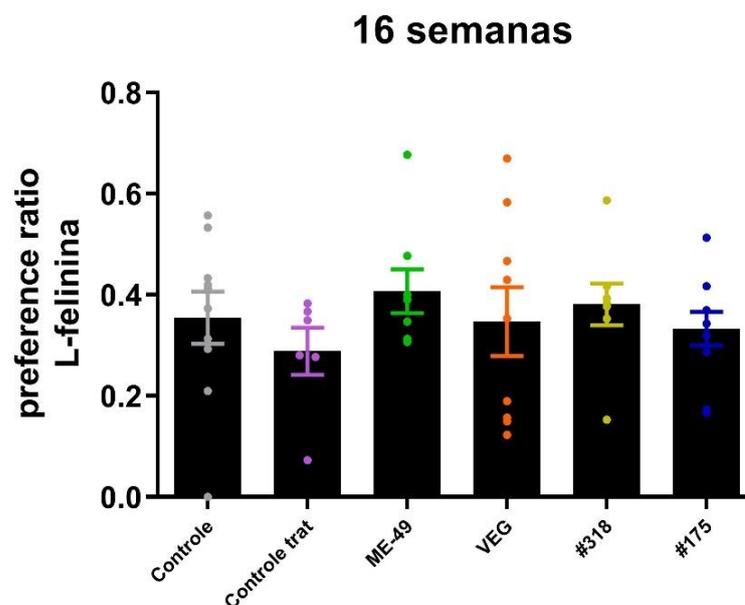


Figura 38. Resultados do cálculo da razão de preferência olfativa referente ao amino ácido L-Felinina, obtidos no teste de Labirinto em Y realizado com dezesseis semanas de infecção, (Controle N=9; Controle Tratado N= 7; ME-49 N=7; VEG N=9; #318 N= 6; #175 N=8). Dados expressos com média \pm SD; $F = 0.5679$, $df = 50$, $p = 0.72$. ANOVA, pós teste de Bonferroni.

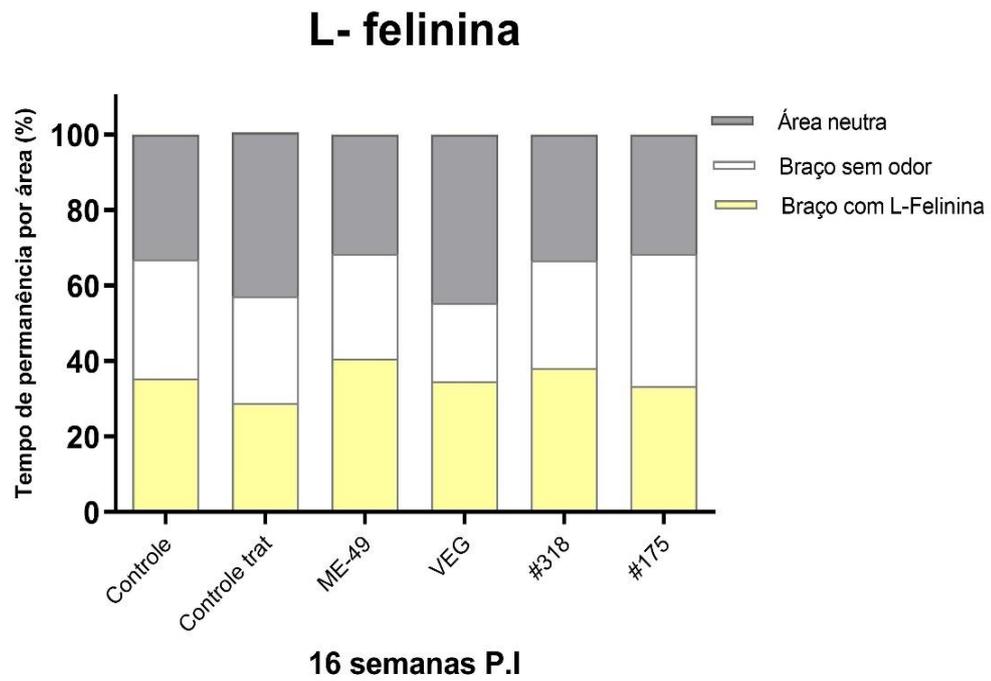


Figura 39. Porcentagem do tempo de permanência nas três regiões do Labirinto em Y em relação a avaliação da L-Felinina. Resultados obtidos do teste realizado com dezesseis semanas pós-infecção. Dados expressos em porcentagem (%). Two-way ANOVA.

6.8 Resultados imagem PET ^{18}F -FDG

Com o objetivo de compreender os efeitos da infecção no SNC, utilizamos o exame de imagem de PET ^{18}F -FDG para avaliar o possível efeito da parasitose no metabolismo da glicose cerebral dos animais infectados por diferentes cepas de *T. gondii*. O exame de imagem foi realizado em seis animais de cada grupo, logo após a segunda etapa dos testes comportamentais na 17ª semana de infecção. A Fig.40 apresenta os resultados de captação do radiofármaco obtidos pelo exame PET ^{18}F -FDG, mostrando imagens adquiridas nos planos coronal, sagital e axial para os diferentes grupos experimentais.

Para efeito de comparação da captação do radiofármaco nas três principais áreas encefálicas (Forebrain, Midbrain e Hindbrain), os dados foram normalizados em relação ao grupo controle. Como podemos observar na Fig. 41, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos quanto à captação do radiofármaco nas três áreas avaliadas, porém os grupos infectados por *T. gondii*, independentemente da cepa, apresentaram maior coeficiente de variação de captação em relação ao grupo controle tanto na região do forebrain (Fig. 41A), como do midbrain (Fig. 41B) e do hindbrain (Fig. 41 C), sendo possível observar animais com alta e com baixa captação do radiofármaco dentro de um mesmo grupo experimental (Fig. 41 A, B e C).

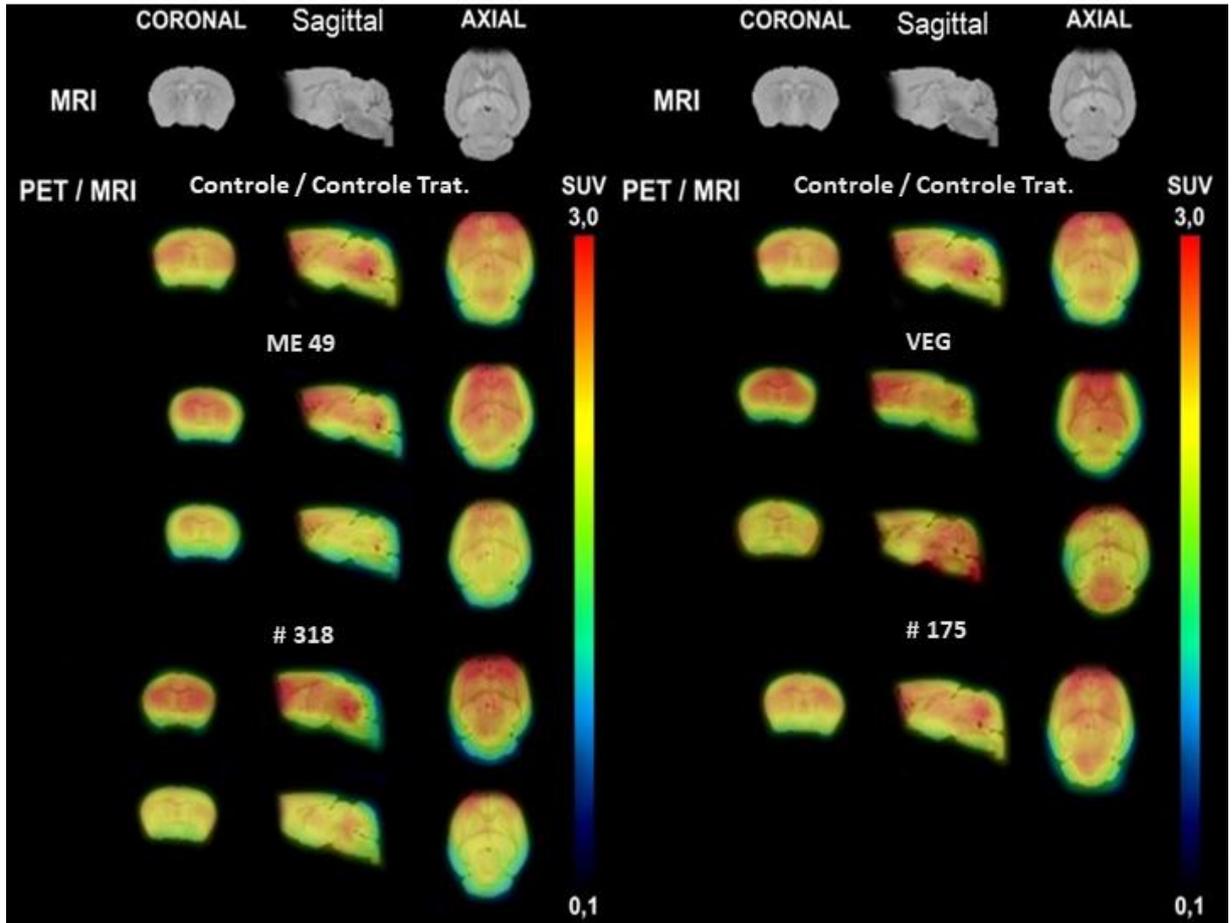


Figura 40. Resultados de captação do radiofármaco pelo exame PET 18 F-FDG. Imagens adquiridas nos planos coronal, sagital e axial para os diferentes grupos experimentais.

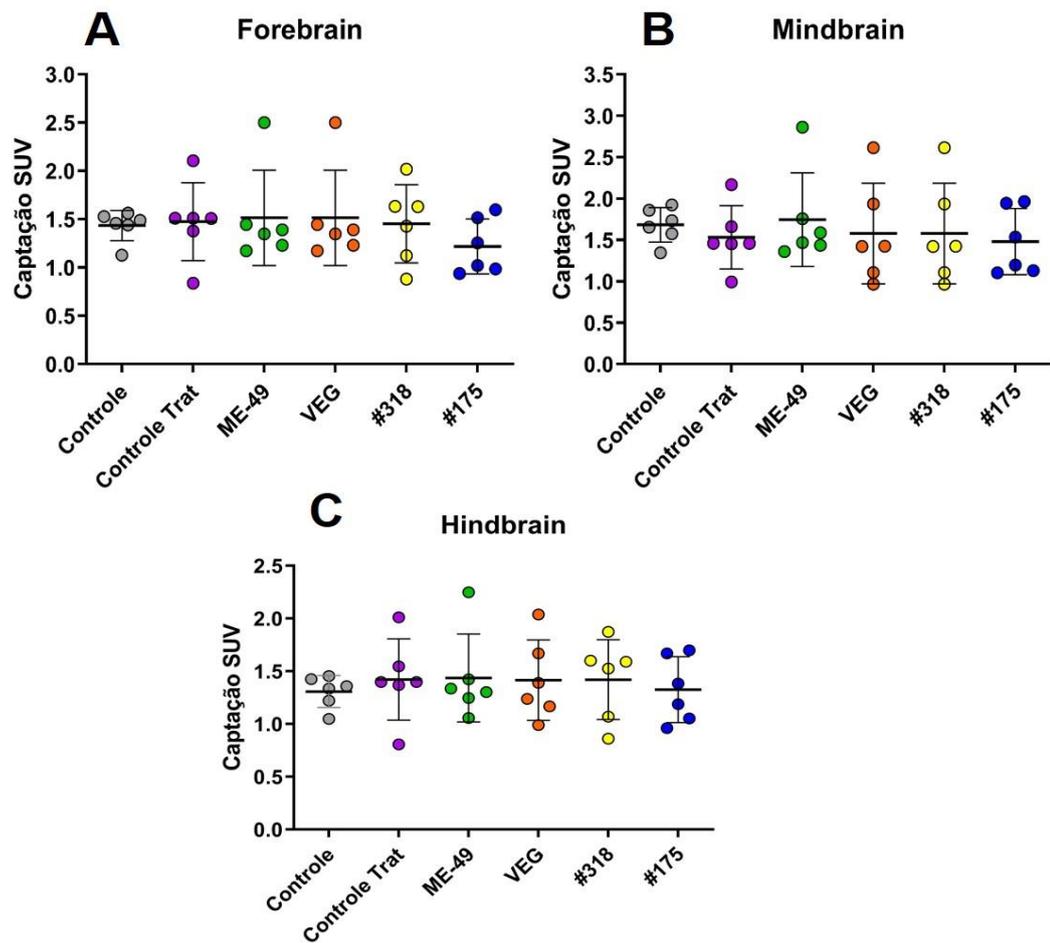


Figura 41. Resultados da comparação da captação do radiofármaco ^{18}F -FDG entre as três regiões encefálicas (Forebrain, Midbrain e Hindbrain) para os diferentes grupos experimentais. (Controle N=6; Controle Tratado N= 6; ME-49 N=6; VEG N=6; #318 N= 6; #175 N=6) ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, vários estudos têm demonstrado que a infecção por *T. gondii* pode provocar alterações comportamentais em modelos experimentais (Vyas et al., 2007; Webster e McConkey, 2010; Afonso; Paixão; Costa, 2012; Bezerra et al., 2019), além de apresentar uma associação com diversos transtornos mentais e comportamentais em humanos (Flegr 2007; Fekadu, Shibre, Clare, 2010; Fond et al., 2013; Flegr 2013), porém a maioria dos estudos experimentais utiliza cepas arquetípicas, ou geneticamente modificadas do parasita, sem descrições do efeito comportamental de cepas não arquetípicas, que são altamente prevalentes na América do Sul, principalmente, no Brasil (Pena et al., 2008; Shwab et al., 2014; Dardé e Ajzenberg, 2014). Em nosso estudo, buscamos avaliar o efeito comportamental e neurofisiológico de cepas não arquetípicas (#175 e #318) e arquetípicas (ME49 e VEG) em modelo murino.

Para avaliação da evolução e gravidade da infecção em modelos experimentais, a análise de fatores como taxa de sobrevivência e peso corporal são parâmetros importantes, pois refletem o estado clínico do hospedeiro e desfecho da doença (Linkenhoker e Linton, 2013). Em nosso estudo, não observamos diferenças em relação à taxa de sobrevivência entre os grupos durante todo o período experimental. Estes achados corroboram os dados descritos por Bezerra et al. (2019) que, também, não observaram alterações na taxa de sobrevivência de animais infectados pelas cepas arquetípicas VEG e ME49. Com relação à massa corporal dos animais, verificamos um aumento significativo do peso de todos os grupos ao longo do experimento, indicando que as infecções causadas pelas cepas de *T. gondii* utilizadas não interferiram no estado físico dos animais. Nossos dados, entretanto, foram discordantes dos achados relatados por Bezerra et al. (2019) que não observaram ganho de peso em animais infectados pelas cepas ME49 e VEG. Tal diferença pode ser atribuída ao tipo de inóculo utilizado na infecção dos animais. Em nosso estudo atual, utilizamos um inóculo de 10^3 taquizoítos, já Bezerra et al. (2019) utilizaram 10 cistos de *T. gondii*. Cabe ressaltar que é difícil quantificar com precisão a carga parasitária presente em inóculos contendo cistos do parasita, pois o número de bradizoítos, presentes em cada cisto tecidual, pode variar na dependência do tamanho do cisto. Por outro lado, inóculos contendo taquizoítos livres permitem uma quantificação exata da carga parasitária.

Em relação à resposta imune humoral, avaliada pela técnica imunoenzimática de ELISA, verificamos que os animais infectados pela cepa arquetípica VEG apresentaram maiores títulos de anticorpos IgG anti - *T. gondii* em comparação com os demais grupos, seguido pelos animais infectados pela cepa arquetípica ME49 e pelas cepas não arquetípicas #175 e #318. Esses achados corroboram com o estudo realizado por Bezerra et al. (2019) que, também, observaram maiores títulos de anticorpos em animais infectados pela cepa VEG. Segundo Mukhopadhyay; Arrang-Solís e Saeji (2020), as diferenças entre a resposta imune induzida pelas cepas arquetípicas do tipo II e III estão associadas às proteínas presentes nas roptrias do parasita. Cepas do tipo III não expressam ROP 18 e apresentam uma estrutura de ROP 16 diferente da encontrada em cepas do tipo II. Assim, o perfil proteico das roptrias das cepas do tipo III interfere no equilíbrio de fatores pró e anti-inflamatórios de maneira distinta do padrão desencadeado pelas cepas do tipo II no decorrer da infecção. Isto poderia esclarecer o fato de cepas do tipo III serem mais imunogênicas que cepas do tipo II. Como apresentam maior imunogenicidade, as cepas do tipo III provocam intensa resposta inflamatória no hospedeiro, gerando eventos neurofisiológicos mais proeminentes que as infecções por cepas do tipo II (Mukhopadhyay; Arrang-Solís; Saeji, 2020;). Da mesma forma, Sanchez e Besteiro (2021) demonstraram que o polimorfismo genético das cepas de *T. gondii* pode influenciar a expressão de células efetoras da resposta imune.

Por outro lado, os baixos títulos de anticorpos, observados nas infecções pelas cepas não arquetípicas #318 e #175, podem ter sido influenciados pelo tratamento com Sulfadiazina e Pirimetamina, instituído no início da infecção para evitar a mortalidade dos animais e garantir a cronicidade da infecção, pois de acordo com o estudo conduzido por Meireles et al. (2022), essas cepas são altamente virulentas para camundongos. Alvarado-Esquivel et al. (2011), também, observaram uma redução da concentração de anticorpos em animais tratados com a mesma associação medicamentosa durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*. Vale ressaltar que a presença de alterações comportamentais em animais infectados por *T. gondii*, mesmo após tratamento medicamentoso, é um fato que merece atenção quando nos reportamos à doença humana, pois os sistemas de vigilância e saúde estão focados na prevenção e tratamento da toxoplasmose congênita e casos agudos sintomáticos da doença, sem levar em consideração o efeito da infecção crônica por

T. gondii nas funções psíquica, mental e cognitiva do indivíduo (Milne; Webster; Walker, 2020).

Nosso estudo, também, observou diferenças significativas entre os grupos em relação à carga parasitária cerebral. De acordo com nossos dados, o grupo infectado pela cepa VEG apresentou maior colonização do SNC, seguido pelo grupo ME49. Estes resultados foram semelhantes aos relatados por estudos anteriores que verificaram maior carga parasitária cerebral em modelos infectados por cepas do tipo III (Bezerra et al., 2019; Tonin et al., 2014). Em relação às cepas não arquetípicas #318 e #175, observamos uma menor colonização do SNC em comparação com as cepas arquetípicas. Da mesma forma que a resposta imune, a colonização do SNC pelas cepas não arquetípicas pode ter sido influenciada pelo tratamento medicamentoso empregado. Alvarado-Esquivel et al (2011) relataram diminuição da carga parasitária cerebral em animais tratados com a mesma combinação medicamentosa usada em nosso estudo. Uma pesquisa pioneira utilizando cepas de *T. gondii*, isoladas de aves silvestres do Brasil, observou diferenças no curso da infecção tanto em “*vitro*”, como em “*vivo*”, com o emprego de Sulfadiazina e Pirimetamina, porém a combinação desses dois medicamentos foi altamente eficaz para a sobrevivência dos animais infectados. Além disso, o estudo demonstrou que a redução da carga parasitária cerebral foi inversamente proporcional à dose utilizada de cada substância (De Lima Bessa et al., 2023).

Em relação à análise comportamental, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à capacidade de aprendizagem e aquisição / retenção de memória (medo condicionado) avaliadas pelo teste de Esquiva Inibitória, divergindo de achados descritos na literatura que observaram alterações desses parâmetros em animais infectados por *T. gondii* (Godwin et al., 2012; Wang et al., 2011; Mahmoudvand et al., 2015; Bezerra et al., 2019). Entretanto, é importante ressaltar que, nestes estudos, a infecção experimental foi realizada com cistos do parasita, ao invés de taquizoítos, sugerindo que animais inoculados com cistos possam receber uma carga parasitária maior em relação àqueles infectados com taquizoítos, como já mencionado, anteriormente, na avaliação do peso corporal. Isto poderia explicar o fato das alterações de aprendizagem e memória terem sido observadas apenas em infecções com cistos do parasita.

Nossos dados demonstraram que a capacidade de aprendizagem e aquisição de memória condicionada foram preservados nos animais infectados por taquizoítos, independentemente, da cepa utilizada. É interessante notar que, em condições naturais, a infecção dos roedores pode ocorrer pela ingestão de oocistos presentes na água e alimentos, ou pela ingestão de presas contendo cistos teciduais do parasita. Além disso, devido ao hábito onívoro, os roedores podem se infectar por meio do canibalismo (Lane-Petter, 1968). Assim, funções cognitivas, como aprendizagem e memória, poderiam ser influenciadas pela forma infectante de *T. gondii*. Isto é extremamente importante, pois a cognição do hospedeiro está diretamente relacionada a sua capacidade de adaptação e sobrevivência no ambiente, uma vez que interfere na sua percepção de risco (Rochais et al., 2022).

Outra questão importante, é a influência da infecção por *T. gondii* no comportamento locomotor e exploratório do hospedeiro. Alguns estudos demonstraram que animais infectados pelo parasita apresentaram aumento das atividades locomotora e exploratória nos testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado (Hodková et al., 2007; Afonso; Paixão; Costa, 2012). Esses achados estão associados à relação presa x predador, uma vez que o aumento da atividade locomotora da presa pode resultar em maior exposição ao predador (Afonso; Paixão; Costa, 2012; Farnworth; Innes; Waas, 2016). Contudo, em nosso estudo, observamos um efeito contrário, já que animais infectados pela cepa não arquetípica #175 apresentaram maior tempo de imobilidade no teste de Campo Aberto realizado na sexta semana de infecção. Para o grupo infectado pela cepa VEG, este efeito foi, ainda, mais proeminente, pois os animais apresentaram redução da locomoção (movimentos horizontais) nos dois períodos avaliados (6ª e 16ª semanas de infecção), indicando que a infecção, por essa cepa, pode ocasionar uma alteração permanente da capacidade locomotora dos animais. Estes dados corroboram estudos anteriores que, também, relataram redução da locomoção em animais infectados por *T. gondii* (González et al., 2007; Gulinello et al., 2010), sobretudo, pela cepa VEG (Bezerra et al., 2019; Dos Santos et al., 2022). Nossos dados demonstraram que o grupo infectado pela cepa VEG, além de apresentar diminuição da capacidade locomotora, também, apresentou redução do comportamento exploratório, conhecido como *Rearing*, que consiste no ato do animal se erguer para explorar e analisar o ambiente ao seu redor, o que é extremamente importante para sua percepção de risco (Lever et al., 2006).

Alteração semelhante já foi descrita por Gulinello et al. (2010), que observaram redução de *Rearing* e *Sniffing*¹⁰ em animais infectados por *T. gondii*, demonstrando que a infecção pelo parasita pode resultar em prejuízo da avaliação e percepção ambiental do risco predatório.

Contudo, não pudemos determinar a causa das alterações locomotoras presentes nos grupos infectados pelas cepas VEG e #175. Mudanças na capacidade sensório - motora de roedores, já, foram descritas em animais infectados por *T. gondii*, pelo emprego do teste de marcha (*footprint*), que demonstrou alterações tanto na amplitude dos passos como na mobilidade do animal, sendo que este último parâmetro foi comprovado pelo arraste das patas traseiras do animal (Gulinello et al., 2010). A habilidade sensório - motora é um fator crucial na relação presa x predador, pois o comprometimento da performance locomotora pode prejudicar o comportamento de fuga do animal, elevando seu risco de predação (Moore e Biewener, 2015).

Estudos voltados para avaliação do comportamento depressivo em animais e humanos, verificaram que a depressão pode causar uma diminuição da atividade locomotora dos indivíduos (Kim et al., 2013; Song e Kim, 2021). Este dado é extremamente relevante, já que estudos experimentais em modelo murino, relataram um efeito tipo-depressivo, incluindo anedonia¹¹, em animais infectados por *T. gondii* (Mahmoud et al., 2016; Rehab et al., 2020; Castano-Barrios et al., 2021). Dados não publicados de Toyoda et al., (2022) demonstraram que animais infectados pela cepa VEG apresentaram comportamento depressivo no teste de Suspensão pela Cauda, além de redução da atividade locomotora no teste de Campo Aberto. Assim, uma hipótese plausível para explicar a redução da atividade locomotora e exploratória nos grupos infectados pelas cepas VEG e #175, seria o fato destas cepas causarem um

¹⁰ Sniffing – farejar – o sniffing exploratório é um dos principais comportamentos exploratórios, no qual roedores conseguem adquirir informações ambientais, já que são animais noturnos. Em conjunto com o tato, o olfato é um sentido primordial para esses animais (Fonio et al., 2015).

¹¹ Anedonia – Segundo o DSM V, a anedonia é um sintoma presente em quadros depressivos e na esquizofrenia, caracterizada por déficit na capacidade de sentir prazer, em modelo experimental, o teste de Preferência pela Sacarose é um importante paradigma metodológico para avaliação da anedonia em roedores. No qual, acredita-se que a redução do consumo da sacarose (substância doce, apreciada por esses animais), seja um indicativo de alterações neurofisiológicas relacionadas ao prazer (Hoffman, 2016).

efeito depressivo nos animais, entretanto, testes adicionais específicos são necessários para confirmação desta hipótese.

Outro fator crucial na avaliação comportamental de roedores infectados pelo *T. gondii*, é aversão do animal ao odor do seu predador. Nossos dados demonstraram que apenas os grupos infectados pelas cepas não arquetípicas #175 e #318 apresentaram redução da aversão ao odor do felino no teste de Labirinto em Y. A chamada “atração fatal” é o comportamento chave da manipulação comportamental induzida por *T. gondii* (Kannan et al., 2010, Vyas et al., 2007). Não se sabe ao certo quais são as bases neurológicas responsáveis por este fenômeno, mas acredita-se que a testosterona tenha um papel importante, pois já foi descrito um aumento nos níveis deste hormônio em ratos machos adultos infectados por *T. gondii* que perderam o medo inato ao odor do felino (Flegr e Markos, 2014). Outra hipótese seria a ocorrência de mudanças na sinalização cerebral olfativa, uma vez que a ativação cerebral de ratos machos infectados por *T. gondii* foi semelhante à de ratos livres da infecção, mas expostos ao odor de fêmeas no estro (House et al., 2011). Dass e Vyas (2014) observaram que a região medial pós-dorsal (MePD) da amígdala de ratos infectados com *T. gondii* é ativada quando os animais são expostos ao odor de urina de gato, já que esta região está associada ao comportamento reprodutivo e social. Adamec et al. (1999) sugeriram que a infecção por *T. gondii* ocasiona alterações na amígdala basolateral, que juntamente com outras regiões cerebrais, é primordial para a resposta ao medo condicionado e inato (Silva et al., 2016). Vale ressaltar que os animais infectados pela cepa #318 não apresentaram alterações locomotoras / exploratórias, nem alterações cognitivas de aprendizagem e memória, indicando que, possivelmente, a infecção por essa cepa tenha um efeito em regiões específicas do SNC, já que apenas o medo inato foi alterado. Silva et al. (2016) observaram diferenças de sinalização cerebral entre o medo condicionado e o medo inato, demonstrando a participação de áreas específicas como hipotálamo e amígdala (Silva et al. 2016; Canteras, 2003). Outra questão importante em relação à infecção pelas cepas não arquetípicas (#175 e #318) é que o efeito comportamental que elas provocaram no hospedeiro não foram decorrentes do tratamento medicamentoso instituído, pois o padrão comportamental dos animais do grupo controle tratado foi semelhante ao padrão do grupo controle sem tratamento. Isto demonstra que apesar da redução da colonização cerebral e menor indução da resposta imune humoral, a

infecção por estas cepas foi capaz de causar mudanças comportamentais relevantes no hospedeiro.

Levando em consideração as diferenças comportamentais entre os grupos infectados pelas cepas VEG, #175 e #318 de *T. gondii*, foi realizado o exame de imagem PET ^{18}F -FDG para avaliar o metabolismo da glicose cerebral em três áreas distintas do SNC (Forebrain, Midbrain e Hindbrain) e sua possível correlação com as alterações comportamentais observadas nesses grupos, porém não detectamos diferenças na captação do radiofármaco nas três áreas avaliadas. Nossos dados foram divergentes daqueles descritos por Xu et al. (2014) que demonstraram um aumento generalizado da captação do radiofármaco no cérebro de animais infectados por *T. gondii*, entretanto, cabe ressaltar que esse estudo, diferentemente do nosso, realizou o exame de imagem na fase aguda da infecção, sugerindo que o aumento da captação foi decorrente do intenso processo inflamatório vigente nesta fase da infecção.

Embora nosso estudo não tenha observado diferenças significativas entre os grupos em relação ao metabolismo da glicose cerebral nas três áreas avaliadas, nossos dados indicam que o perfil metabólico cerebral presente na infecção crônica é diferente daquele observado na fase aguda da infecção. Isto poderia estar associado às variações no padrão da resposta imune do hospedeiro ao longo da infecção e, também, à gravidade das lesões cerebrais decorrentes dos processos neurodegenerativos que podem ocorrer durante a cronificação da infecção (Dincel e Atmaca, 2015; Liu et al., 2018; Atmaca et al., 2014). O exame de imagem PET ^{18}F -FDG, tem sido utilizado como uma importante ferramenta de diagnóstico e caracterização de inúmeras doenças e alterações neurológicas. Como avalia o metabolismo da glicose cerebral em repouso, este exame permite a identificação de áreas do SNC com hipometabolismo da glicose cerebral, prevendo atrofia cerebral em diferentes formas de demência (Herholz, 2003; González-Redondo et al., 2014; Liguori et al., 2019), porém em modelos de infecção experimental por *T. gondii*, o emprego de exames de neuroimagem é extremamente escasso, mesmo já tendo sido relatada a ocorrência de lesões neurodegenerativas em roedores infectados pelo parasita (Ortiz-Guerreiro et al., 2020; Li et al., 2019). Assim, o emprego de exames de imagem, como PET ^{18}F -FDG, poderia auxiliar na compreensão de processos neurodegenerativos e neuroinflamatórios em animais infectados por *T. gondii*.

Os dados do presente estudo são pioneiros e fornecem um panorama inédito do efeito comportamental de cepas não arquetípicas, comparadas com cepas arquetípicas de *T. gondii*, mostrando que as alterações comportamentais apresentam um efeito cepa - dependente. Além disso, oferece uma abordagem promissora para futuras pesquisas que possam utilizar técnicas de imagem, visando maior compreensão do estado fisiológico neuronal e sua possível influência no comportamento de roedores, possibilitando uma visão translacional para casos humanos da doença.

8. CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível avaliar o efeito da infecção crônica por cepas geneticamente distintas de *T. gondii* em camundongos Balb/c, demonstrando um efeito comportamental cepa-dependente.

Nossos dados são inéditos em relação às cepas não arquetípicas de *T. gondii* isoladas de casos humanos de toxoplasmose gestacional, demonstrando que a infecção por essas cepas causa efeito comportamental diferenciado em camundongos, já que os animais infectados pelas cepas # 318 e # 175 apresentaram redução da aversão ao odor do felino, que representa o efeito comportamental mais marcante da toxoplasmose. Esses achados ressaltam a importância da infecção por cepas não arquetípicas no fitness ecológico do protozoário. Isto é particularmente interessante, dado que o perfil genético da população parasitária da América do Sul, em especial, do Brasil é distinto do perfil de outras regiões geográficas. Assim, avaliar as alterações comportamentais em cepas não arquetípicas é algo novo e importante para a compreensão do papel da diversidade genética de *T.gondii* na manifestação clínica da toxoplasmose.

Outro dado extremamente importante deste estudo é a observação de alterações comportamentais em animais que foram submetidos ao tratamento medicamentoso para toxoplasmose, com aparente controle da infecção (redução da resposta imune humoral e redução da colonização parasitária cerebral em comparação com as cepas arquetípicas). Esse achado traz o questionamento se, em casos humanos de toxoplasmose, poderia ocorrer o desenvolvimento de alterações comportamentais, ou de sintomas relacionados a transtornos psiquiátricos com o passar do tempo? Da mesma forma, será que o tratamento convencional seria suficiente para prevenir alterações neurofisiológicas que possam ter efeito comportamental? Nosso estudo, também, demonstrou que o tratamento medicamentoso não interfere no comportamento de camundongos, uma vez que os resultados do grupo controle tratado foram muito semelhantes ao grupo controle convencional.

Apesar de vários estudos correlacionarem a infecção por *T.gondii* com transtornos psiquiátricos em humanos, compreender o efeito comportamental da

infecção pelo parasita em camundongos é um passo importante para entender como a infecção pode aumentar o sucesso ecológico de *T. gondii* e quais mecanismos neurofisiológicos estariam envolvidos nesse processo.

REFERÊNCIAS

1. Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle--effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol Behav.* 1999 Jan 1-15;65(4-5):739-51. doi: 10.1016/s0031-9384(98)00225-x. PMID: 10073475.
2. Afonso C, Paixão VB, Costa RM. Chronic *Toxoplasma* infection modifies the structure and the risk of host behavior. *PLoS One.* 2012;7(3):e32489. doi: 10.1371/journal.pone.0032489. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22431975; PMCID: PMC3303785.
3. Ahmad Saleh AM, Al-Agroudi MA, Morsy TA. Occupational, Nosocomial or Hospital acquired Toxoplasmosis. *J Egypt Soc Parasitol.* 2016 Aug;46(2):407-418. PMID: 30152951.
4. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med.* 2001 Jan 6;2001:1-19. doi: 10.1017/S1462399401002204. PMID: 14987357.
5. Albuquerque FS, Silva RH. Amygdala and the slight boundary between memory and emotion *Rev. psiquiatr.* 2009 Apr;31(3): 1-18.
6. Alvarado-Esquivel C, Niewiadomski A, Schweickert B, Liesenfeld O. Antiparasitic treatment suppresses production and avidity of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in a murine model of acute infection*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2011 Sep;1(3):249-55. doi: 10.1556/EuJMI.1.2011.3.9. Epub 2011 Sep 9. PMID: 24516731; PMCID: PMC3906621.
7. Azuma, HI, Teruo S, Takeshi K, Satoshi U, Takanobu S, Yuko M, Kentaro T, Motomu S, Naoki M, Hiroshi T, Kiyoshi K, Yoji W, Masahito. γ -Aminobutyric Acid as a Promoting Factor of Cancer Metastasis; Induction of Matrix Metalloproteinase Production Is Potentially Its Underlying Mechanism. *Cancer research.* [internet] 2004. [citado 01 fev. 2023] 63. 8090-6.____Disponível em : https://www.researchgate.net/publication/8956383_g-Aminobutyric_Acid_as_a_Promoting_Factor_of_Cancer_Metastasis_Induction_of_Matrix_Metalloproteinase_Production_Is_Potentially_Its_Underlying_Mechanism
8. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 2003 Sep;11(9):426-30. doi: 10.1016/s0966-842x(03)00205-1. PMID: 13678858.
9. Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med.* 2002 Jun 17;195(12):1625-33. doi: 10.1084/jem.20020258. PMID: 12070289; PMCID: PMC2193562.
10. Bedoya-Pérez MA, Smith KL, Kevin RC, Luo JL, Crowther MS and McGregor IS (2019) Parameters That Affect Fear Responses in Rodents and How to Use Them for Management. *Front. Ecol. Evol.* 7:136. doi: 10.3389/fevo.2019.00136

11. Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Proc Biol Sci. 2000 Aug 7;267(1452):1591-4. doi: 10.1098/rspb.2000.1182. PMID: 11007336; PMCID: PMC1690701.
12. 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. Disponível em: 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.
13. Bezerra ECM, Dos Santos SV, Dos Santos TCC, de Andrade HF Junior, Meireles LR. Behavioral evaluation of BALB/c (*Mus musculus*) mice infected with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. Microb Pathog. 2019 Jan;126:279-286. doi: 10.1016/j.micpath.2018.11.021. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30447421.
14. Bhandage AK, Kanatani S, Barragan A. *Toxoplasma*-Induced Hypermigration of Primary Cortical Microglia Implicates GABAergic Signaling. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Mar 20;9:73. doi: 10.3389/fcimb.2019.00073. PMID: 30949457; PMCID: PMC6436526.
15. Bhattarai UR, Doherty JF, Dowle E, Gemmell NJ. The Adaptiveness of Host Behavioural Manipulation Assessed Using Tinbergen's Four Questions. Trends Parasitol. 2021 Jul;37(7):597-609. doi: 10.1016/j.pt.2021.01.006. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33568325.
16. Boillat M, Hammoudi PM, Dogga SK, Pagès S, Goubran M, Rodriguez I, Soldati-Favre D. Neuroinflammation-Associated Aspecific Manipulation of Mouse Predator Fear by *Toxoplasma gondii*. Cell Rep. 2020 Jan 14;30(2):320-334.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.019. PMID: 31940479; PMCID: PMC6963786.
17. 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. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00349-1. PMID: 12160866.
18. 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. doi: 10.1023/a:1010399322861. PMID: 11471938.
19. Brynska A, Tomaszewicz-Libudzic E, Wolanczyk T. Obsessive-compulsive disorder and acquired toxoplasmosis in two children. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2001 Sep;10(3):200-4. doi: 10.1007/s007870170027. PMID: 11596821.
20. Canteras NS, Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. Ver. Bras. Psiquiatr. 2003. 25:21-24. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-44462003000600005>.
21. Carne B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2009 Apr;15(4):656-8. doi: 10.3201/eid1504.081306. PMID: 19331765; PMCID: PMC2671434.

22. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002 Aug 21;134(1-2):49-57. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00452-1. PMID: 12191791.
23. Carter CJ. Toxoplasmosis and Polygenic Disease Susceptibility Genes: Extensive *Toxoplasma gondii* Host/Pathogen Interactome Enrichment in Nine Psychiatric or Neurological Disorders. *J Pathog.* 2013;2013:965046. doi: 10.1155/2013/965046. Epub 2013 Mar 4. PMID: 23533776; PMCID: PMC3603208.
24. Castaño Barrios L, Da Silva Pinheiro AP, Gibaldi D, Silva AA, Machado Rodrigues E Silva P, Roffê E, da Costa Santiago H, Tostes Gazzinelli R, Mineo JR, Silva NM, Lannes-Vieira J. Behavioral alterations in long-term *Toxoplasma gondii* infection of C57BL/6 mice are associated with neuroinflammation and disruption of the blood brain barrier. *PLoS One.* 2021 Oct 5;16(10):e0258199. doi: 10.1371/journal.pone.0258199. PMID: 34610039; PMCID: PMC8491889.
25. Celik T, Kamişli O, Babür C, Cevik MO, Oztuna D, Altınayar S. Is there a relationship between *Toxoplasma gondii* infection and idiopathic Parkinson's disease? *Scand J Infect Dis.* 2010 Aug;42(8):604-8. doi: 10.3109/00365541003716500. PMID: 20380545.
26. CDC.gov. [homepage on the internet] USA. Centers for Disease Control and Prevention. *Toxoplasmosis: life cycle.* Atlanta: CDC; 2010. [citado 10 out. 2021]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>.
27. Chieffi PP. Parasitoses e alterações comportamentais. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo.* 2015;60:76-84.
28. Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001 May;25(3):235-60. doi: 10.1016/s0149-7634(01)00011-2. PMID: 11378179.
29. 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. doi: 10.1006/hbeh.1997.1382. PMID: 9213134.
30. Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite.* 2008 Sep;15(3):366-71. doi: 10.1051/parasite/2008153366. PMID: 18814708.
31. Dardé ML, Mercier A, Su C, Khan A, Grigg ME. In: L.M Weiss and K. Kim. *Toxoplasma gondii.* 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; (2014). Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii* (p. 61-67).
32. De Lima Bessa G, Vitor RWA, Lobo LMS, Rêgo WMF, de Souza GCA, Lopes REN, Costa JGL, Martins-Duarte ES. In vitro and in vivo susceptibility to sulfadiazine and pyrimethamine of *Toxoplasma gondii* strains isolated from Brazilian free wild birds. *Sci Rep.* 2023 May 5;13(1):7359. doi: 10.1038/s41598-023-34502-3. PMID: 37147353; PMCID: PMC10162961.

33. Dellacasa-Lindberg I, Fuks JM, Arrighi RB, Lambert H, Wallin RP, Chambers BJ, Barragan A. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2011 Aug;79(8):3046-52. doi: 10.1128/IAI.01042-10. Epub 2011 May 31. PMID: 21628522; PMCID: PMC3147544.
34. Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 1;45(7):e88-95. doi: 10.1086/521246. Epub 2007 Aug 27. PMID: 17806043.
35. Dias EHV, De Carvalho EB, Pereira DS. Princípios básicos e aplicações oncológicas da PET-CT/18F-FDG. *Revista De Medicina*. 2020. 99(2), 156-163. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i2p156-163>
36. Dubey. 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, p.1-313.
37. Ermel, AC, Grave, MTQ. O índice de Apgar em bebês recém-nascidos em um hospital de pequeno porte de um município do Vale de Paranhana. *Revista Destaques Acadêmicos [internet]*. 2011. [citado 04 mar. 2022]; N3, p-7-12. Disponível em: <http://www.univates.br/revistas/index.php/destaques/article/view/107>
38. Farnworth B, Innes J, Waas JR. Converting Predation Cues into Conservation Tools: The Effect of Light on Mouse Foraging Behaviour. *PLoS One*. 2016 Jan 13;11(1):e0145432. doi: 10.1371/journal.pone.0145432. PMID: 26760039; PMCID: PMC4711984.
39. Fekadu A, Shibre T, Cleare AJ. Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders--overview of evidence and mechanisms. *Folia Parasitol (Praha)*. 2010 Jun;57(2):105-13. doi: 10.14411/fp.2010.013. PMID: 20608472.
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. doi: 10.1371/journal.pntd.0001389. Epub 2011 Nov 8. PMID: 22087345; PMCID: PMC3210761.
41. Flegr J, Markoš A. Masterpiece of epigenetic engineering - how *Toxoplasma gondii* reprogrammes host brains to change fear to sexual attraction. *Mol Ecol*. 2014 Dec;23(24):5934-6. doi: 10.1111/mec.13006. PMID: 25532868.
42. Flegr J. Effects of toxoplasma on human behavior. *Schizophr Bull*. 2007 May;33(3):757-60. doi: 10.1093/schbul/sbl074. Epub 2007 Jan 11. PMID: 17218612; PMCID: PMC2526142.
43. Flegr J. Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. *J Exp Biol*. 2013 Jan 1;216(Pt 1):127-33. doi: 10.1242/jeb.073635. PMID: 23225875.

44. Fond G, Capdevielle D, Macgregor A, Attal J, Larue A, Brittner M, Ducasse D, Boulenger JP. *Toxoplasma gondii*: un rôle potentiel dans la genèse de troubles psychiatriques. Une revue systématique de la littérature [Toxoplasma gondii: a potential role in the genesis of psychiatric disorders]. *Encephale*. 2013 Feb;39(1):38-43. French. doi: 10.1016/j.encep.2012.06.014. Epub 2012 Aug 21. PMID: 23095600.
45. Fonio, E., Gordon, G., Barak, N., Winetraub, Y., Oram, T. B., Haidarliu, S., Kimchi, T., & Ahissar, E. (2015). Coordination of sniffing and whisking depends on the mode of interaction with the environment, *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 61(2), 95-105. doi: <https://doi.org/10.1080/15659801.2015.1124656>
46. Galeh TM, Sarvi S, Montazeri M, Moosazadeh M, Nakhaei M, Shariatzadeh SA, Daryani A. Global Status of *Toxoplasma gondii* Seroprevalence in Rodents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Vet Sci*. 2020 Jul 31;7:461. doi: 10.3389/fvets.2020.00461. PMID: 32851037; PMCID: PMC7411222.
47. Gering E, Laubach ZM, Weber PSD, Soboll Hussey G, Lehmann KDS, Montgomery TM, Turner JW, Perng W, Pioon MO, Holekamp KE, Getty T. *Toxoplasma gondii* infections are associated with costly boldness toward felids in a wild host. *Nat Commun*. 2021 Jun 22;12(1):3842. doi: 10.1038/s41467-021-24092-x. PMID: 34158487; PMCID: PMC8219747.
48. Gonzalez LE, Rojnik B, Urrea F, Urdaneta H, Petrosino P, Colasante C, Pino S, Hernandez L. *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. doi: 10.1016/j.bbr.2006.11.012. Epub 2006 Dec 12. PMID: 17169442.
49. González-Redondo R, García-García D, Clavero P, Gasca-Salas C, García-Eulate R, Zubieta JL, Arbizu J, Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC. Grey matter hypometabolism and atrophy in Parkinson's disease with cognitive impairment: a two-step process. *Brain*. 2014 Aug;137(Pt 8):2356-67. doi: 10.1093/brain/awu159. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24951642; PMCID: PMC4610189.
50. Goodwin D, Hrubec TC, Klein BG, Strobl JS, Werre SR, Han Q, Zajac AM, Lindsay DS. 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. doi: 10.1645/GE-3068.1. Epub 2012 Apr 2. PMID: 22468990.
51. Goshen, Inbal & Yirmiya, Raz. (2007). The Role of Pro-inflammatory Cytokines in Memory Processes and Neural Plasticity. *Psychoneuroimmunology*, Two-Volume Set. 1. 337-377. 10.1016/B978-012088576-3/50021-6.
52. Groër MW, Yolken RH, Xiao JC, Beckstead JW, Fuchs D, Mohapatra SS, Seyfang A, Postolache TT. Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii*-positive women. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 May;204(5):433.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2011.01.004. Epub 2011 Feb 23. PMID: 21345406; PMCID: PMC3144318.
53. 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 10 mai.2023]. Disponível em:<http://www.inec-usp.org/cursos/cursoll/cursoll.htm>

54. Gulinello M, Acquarone M, Kim JH, Spray DC, Barbosa HS, Sellers R, Tanowitz HB, Weiss LM. 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. doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.009. Epub 2010 Mar 27. PMID: 20348009; PMCID: PMC2891993.

55. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934. 18:385-403. doi: <https://doi.org/10.1037/H0071444>

56. Hansen, Thomas. (2018). Fitness in Evolutionary Biology. 10.20944/preprints201804.0271.v1.

57. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0035516. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22530040; PMCID: PMC3329480.

58. Hassan MA, Olijnik AA, Fricke EM, Saeij JP. Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *Int J Parasitol.* 2019 Jan;49(1):63-70. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.08.007. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30471286; PMCID: PMC6344230.

59. Helland-Riise SH, Vindas MA, Johansen IB, Nadler LE, Weinersmith KL, Hechinger RF, Øverli Ø. Brain-encysting trematodes (*Euhaplorchis californiensis*) decrease raphe serotonergic activity in California killifish (*Fundulus parvipinnis*). *Biol Open.* 2020 Jul 8;9(7):bio049551. doi: 10.1242/bio.049551. PMID: 32439741; PMCID: PMC7358127.

60. Hendriks WH, Moughan PJ, Tarttelin MF, Woolhouse AD. Felinine: a urinary amino acid of Felidae. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1995 Dec;112(4):581-8. doi: 10.1016/0305-0491(95)00130-1. PMID: 8590373.

61. Herholz K. PET studies in dementia. *Ann Nucl Med.* 2003 Apr;17(2):79-89. doi: 10.1007/BF02988444. PMID: 12790355.

62. Hill, D.E., and Dubey, J.P. *Toxoplasmosis*: Reston, Va., U.S. Geological Survey Circular 1389. 2014. 84 p., 1 appendix. doi: <http://dx.doi.org/10.3133/cir1389>.

63. Hodková, P. Kolbeková, A. Skallová, J. Lindová, J. Flegr. Higher perceived dominance in *Toxoplasma* infected men--a new evidence for role of increased level of testosterone in toxoplasmosis-associated changes in human behavior. *Neuro Endocrinol Lett.* 28(2) (2007) 110-4. PMID: 17435678.

64. Hoffman KL. New dimensions in the use of rodent behavioral tests for novel drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(4):343-53. doi: 10.1517/17460441.2016.1153624. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26894954.

65. Holmes, J. C., and Bethel, W. M. In *Behavioral Aspects of Parasite Transmission* (E. U. Canning and C. A. Wright, eds.). New York: Academic Press. 1972. Modification of intermediate host behavior by parasites (pp. 128–149).
66. Horacek J, Flegr J, Tintera J, Verebova K, Spaniel F, Novak T, Brunovsky M, Bubenikova-Valesova V, Holub D, Palenicek T, Höschl C. Latent toxoplasmosis reduces gray matter density in schizophrenia but not in controls: voxel-based-morphometry (VBM) study. *World J Biol Psychiatry*. 2012 Oct;13(7):501-9. doi: 10.3109/15622975.2011.573809. Epub 2011 May 23. PMID: 21599563.
67. Hosoi R, Matsumura A, Mizokawa S, Tanaka M, Nakamura F, Kobayashi K, Watanabe Y, Inoue O. MicroPET detection of enhanced 18F-FDG utilization by PKA inhibitor in awake rat brain. *Brain Res*. 2005 Mar 28;1039(1-2):199-202. doi: 10.1016/j.brainres.2005.01.064. PMID: 15781062.
68. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0023277. Epub 2011 Aug 17. PMID: 21858053; PMCID: PMC3157360.
69. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995 Dec;172(6):1561-6. doi: 10.1093/infdis/172.6.1561. PMID: 7594717.
70. Hsu PC, Groer M, Beckie T. New findings: depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2014 Nov;26(11):629-637. doi: 10.1002/2327-6924.12129. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24715687.
71. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0075246. PMID: 24058668; PMCID: PMC3776761.
72. 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.
73. 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. doi: 10.14411/fp.2010.019. PMID: 20608478.
74. Karthikeyan R, Anbazhagan S, Srinivas K, Angappan M, Agri H, Yadav A. Toxoplasmosis: Mysterious Disease with Paradigm for One Health. *International Journal of Livestock Research*, 2021. 11(1), 1-12. doi: <http://dx.doi.org/10.5455/ijlr.20200921065456>
75. Kaushik M, Knowles SC, Webster JP. What makes a feline fatal in *Toxoplasma gondii*'s fatal feline attraction? Infected rats choose wild cats. *Integr Comp Biol*. 2014 Jul;54(2):118-28. doi: 10.1093/icb/icu060. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24907200.

76. 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. doi: 10.1016/0006-8993(94)91667-5. PMID: 7914815.
77. Kim HW, Won KS, Choi BW, Zeon SK. Cerebral Toxoplasmosis in a Patient with AIDS on F-18 FDG PET/CT. *Nucl Med Mol Imaging.* 2010 Apr;44(1):75-7. doi: 10.1007/s13139-009-0014-3. Epub 2010 Feb 26. PMID: 24899941; PMCID: PMC4042964.
78. Kim J, Nakamura T, Kikuchi H, Sasaki T, Yamamoto Y. Co-variation of depressive mood and locomotor dynamics evaluated by ecological momentary assessment in healthy humans. *PLoS One.* 2013 Sep 13;8(9):e74979. doi: 10.1371/journal.pone.0074979. PMID: 24058642; PMCID: PMC3773004.
79. Koçak, H. T Atmaca, O. S. Terzi, H. Ozdemir, T. Uzunalioglu, O. Kul, *et al.*, Experimental Chronic Toxoplasmosis model in mice: brain lesions and related behavioral changes. *Arch Neuropsychiatry.* 2012. 49: 139-144.doi. <https://acikerisim.kku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12587/5364>
80. Komal, S, Nadeem, S, Faheem, Z, Raza, A. Sarwer, K, Umer, H, Roohi, S, Naqvi, S. A. R. Localization Mechanisms of Radiopharmaceuticals. In: Naqvi, S. A. R. , Imrani, M. B. , editors. *Medical Isotopes [Internet].* London: IntechOpen; 2020 [cited 2022 Oct 28]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/73661> doi: 10.5772/intechopen.94099
81. Kornblum HI, Araujo DM, Annala AJ, Tatsukawa KJ, Phelps ME, Cherry SR. In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET). *Nat Biotechnol.* 2000 Jun;18(6):655-60. doi: 10.1038/76509. PMID: 10835605.
82. Kusbeci OY, Miman O, Yaman M, Aktepe OC, Yazar S. Could *Toxoplasma gondii* have any role in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2011 Jan-Mar;25(1):1-3. doi: 10.1097/WAD.0b013e3181f73bc2. PMID: 20921875.
83. Laing C, Blanchard N, McConkey GA. Noradrenergic Signaling and Neuroinflammation Crosstalk Regulate *Toxoplasma gondii*-Induced Behavioral Changes. *Trends Immunol.* 2020 Dec;41(12):1072-1082. doi: 10.1016/j.it.2020.10.001. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33214056.
84. 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. doi: 10.1017/S0031182008004666. Epub 2008 Jul 14. PMID: 18620624.
85. Lane-Petter W. Parental Injuries to Offspring: Cannibalism in Rats and Mice. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1968;61(12):1295-1296. doi:10.1177/003591576806101228
86. Lever C, Burton S, O'Keefe J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci.* 2006;17(1-2):111-33. doi: 10.1515/revneuro.2006.17.1-2.111. PMID: 16703946.

87. Li Y, Severance EG, Viscidi RP, Yolken RH, Xiao J. Persistent *Toxoplasma* Infection of the Brain Induced Neurodegeneration Associated with Activation of Complement and Microglia. *Infect Immun*. 2019 Jul 23;87(8):e00139-19. doi: 10.1128/IAI.00139-19. PMID: 31182619; PMCID: PMC6652752.
88. Li Y, Viscidi RP, Kannan G, McFarland R, Pletnikov MV, Severance EG, Yolken RH, Xiao J. Chronic *Toxoplasma gondii* Infection Induces Anti-N-Methyl-d-Aspartate Receptor Autoantibodies and Associated Behavioral Changes and Neuropathology. *Infect Immun*. 2018 Sep 21;86(10):e00398-18. doi: 10.1128/IAI.00398-18. PMID: 30037790; PMCID: PMC6204742.
89. Libersat F, Kaiser M, Emanuel S. Mind Control: How Parasites Manipulate Cognitive Functions in Their Insect Hosts. *Front Psychol*. 2018 May 1;9:572. doi: 10.3389/fpsyg.2018.00572. PMID: 29765342; PMCID: PMC5938628.
90. Liguori C, Ruffini R, Olivola E, Chiaravalloti A, Izzi F, Stefani A, Pierantozzi M, Mercuri NB, Modugno N, Centonze D, Schillaci O, Placidi F. Cerebral glucose metabolism in idiopathic REM sleep behavior disorder is different from tau-related and α -synuclein-related neurodegenerative disorders: A brain [18F]FDG PET study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019 Jul; 64:97-105. doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.03.017. Epub 2019 Mar 23. PMID: 30930059.
91. Linkenhoker JR, Linton CG. Effect of nesting material on body weights of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2013 Sep;52(5):531-3. PMID: 24041206; PMCID: PMC3784656.
92. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017; 2:17023-. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23. Epub 2017 Jul 14. PMID: 29158945; PMCID: PMC5661633.
93. Mahmoud ME, Fereig R, Nishikawa Y. Involvement of Host Defense Mechanisms against *Toxoplasma gondii* Infection in Anhedonic and Despair-Like Behaviors in Mice. *Infect Immun*. 2017 Mar 23;85(4):e00007-17. doi: 10.1128/IAI.00007-17. PMID: 28138019; PMCID: PMC5364308.
94. Mahmoudvand H, Ziaali N, Aghaei I, Sheibani V, Shojaee S, Keshavarz H, Shabani M. The possible association between *Toxoplasma gondii* infection and risk of anxiety and cognitive disorders in BALB/c mice. *Pathog Glob Health*. 2015;109(8):369-76. doi: 10.1080/20477724.2015.1117742. PMID: 26924347; PMCID: PMC4809231.
95. Marcus C, Feizi P, Hogg J, Summerfield H, Castellani R, Sriwastava S, Marano GD. Imaging in Differentiating Cerebral Toxoplasmosis and Primary CNS Lymphoma With Special Focus on FDG PET/CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2021 Jan;216(1):157-164. doi: 10.2214/AJR.19.22629. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33112669.
96. 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. doi: 10.1016/j.pt.2008.03.012. Epub 2008 May 29. PMID: 18514029.
97. McFarland R, Wang ZT, Jouroukhin Y, Li Y, Mychko O, Coppens I, Xiao J, Jones-Brando L, Yolken RH, Sibley LD, Pletnikov MV. AAH2 gene is not required for

dopamine-dependent neurochemical and behavioral abnormalities produced by *Toxoplasma* infection in mouse. *Behav Brain Res.* 2018 Jul 16;347:193-200. doi: 10.1016/j.bbr.2018.03.023. Epub 2018 Mar 16. PMID: 29555339; PMCID: PMC6237081.

98. Meireles LR, Bezerra ECM, Andrade JQ, Cassiano LA, Pena HFJ, Alves BF, Francisco RPV, de Andrade HF Jr. Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from human congenital toxoplasmosis cases reveal a new virulent genotype in São Paulo, Brazil. *Parasitol Res.* 2022 Nov;121(11):3223-3228. doi: 10.1007/s00436-022-07643-z. Epub 2022 Sep 2. PMID: 36053347.

99. Mendez OA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog.* 2017 Jul 20;13(7):e1006351. doi: 10.1371/journal.ppat.1006351. PMID: 28727854; PMCID: PMC5519211.

100. Menendez JA, Lilien DL, Nanda A, Polin RS. Use of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography for the differentiation of cerebral lesions in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Neurosurg Focus.* 2000 Feb 15;8(2):e2. doi: 10.3171/foc.2000.8.2.3. PMID: 16869549.

101. Mercier A, Garba M, Bonnabau H, Kane M, Rossi JP, Dardé ML, Dobigny G. Toxoplasmosis seroprevalence in urban rodents: a survey in Niamey, Niger. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Jun;108(4):399-407. doi: 10.1590/S0074-0276108042013002. PMID: 23828008; PMCID: PMC3970615.

102. Milne G, Webster JP, Walker M. *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? *Trends Parasitol.* 2020 Dec;36(12):959-969. doi: 10.1016/j.pt.2020.08.005. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33012669.

103. Miman O, Kusbeci OY, Aktepe OC, Cetinkaya Z. The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2010 May 21;475(3):129-31. doi: 10.1016/j.neulet.2010.03.057. Epub 2010 Mar 27. PMID: 20350582.

104. 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. doi: 10.1242/dmm.009928. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23104989; PMCID: PMC3597033.

105. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004 Jun 12;363(9425):1965-76. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X. PMID: 15194258.

106. Moore AH, Osteen CL, Chatziioannou AF, Hovda DA, Cherry SR. Quantitative assessment of longitudinal metabolic changes "in vivo" after traumatic brain injury in the adult rat using FDG-microPET. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Oct;20(10):1492-501. doi: 10.1097/00004647-200010000-00011. PMID: 11043912.

107. Moore TY, Biewener AA. Outrun or Outmaneuver: Predator-Prey Interactions as a Model System for Integrating Biomechanical Studies in a Broader Ecological and Evolutionary Context. *Integr Comp Biol.* 2015 Dec;55(6):1188-97. doi: 10.1093/icb/icv074. Epub 2015 Jun 27. PMID: 26117833.

108. Morgado, P. Resposta Neuronal ao Stress. In: MINHO, Universidade do. Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS). Braga: Lidel - Edições Técnicas, 2017. p. 1-18. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/50828>. Acesso em: 17 abr. 2022
109. Mosconi L. Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. *Clin Transl Imaging*. 2013 Aug;1(4):10.1007/s40336-013-0026-y. doi: 10.1007/s40336-013-0026-y. PMID: 24409422; PMCID: PMC3881550.
110. Mukhopadhyay D, Arranz-Solís D, Saeij JPJ. Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During *Toxoplasma* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Oct 15;10:580425. doi: 10.3389/fcimb.2020.580425. PMID: 33178630; PMCID: PMC7593385.
111. Muradian V, Ferreira LR, Lopes EG, Esmerini Pde O, Pena HF, Soares RM, Gennari SM. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *J Parasitol*. 2012 Feb;98(1):128-34. doi: 10.1645/GE-2817.1. Epub 2011 Jul 26. PMID: 21790367.
112. 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.
113. Na KS, Jung HY, Kim YK. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Jan 3;48:277-86. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.10.022. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23123365.
114. Nasrallah, HA. I have a dream ... for psychiatry. *Current Psychiatry*. 2021 November;20(11):12-14 | doi: 10.12788/cp.0184
115. Ortiz-Guerrero G, Gonzalez-Reyes RE, de-la-Torre A, Medina-Rincón G, Nava-Mesa MO. Pathophysiological Mechanisms of Cognitive Impairment and Neurodegeneration by *Toxoplasma gondii* Infection. *Brain Sci*. 2020 Jun 12;10(6):369. doi: 10.3390/brainsci10060369. PMID: 32545619; PMCID: PMC7349234.
116. Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H, Eto K. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol*. 1994 Aug;164(2):409-19. doi: 10.1006/dbio.1994.1211. PMID: 8045344..
117. Owen-Smith N, Fryxell JM, Merrill EH. Foraging theory upscaled: the behavioural ecology of herbivore movement. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010 Jul 27;365(1550):2267-78. doi: 10.1098/rstb.2010.0095. PMID: 20566503; PMCID: PMC2894968.
118. Papes F, Logan DW, Stowers L. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell*. 2010 May 14;141(4):692-703. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.037. PMID: 20478258; PMCID: PMC2873972.

119. Parlog A, Harsan LA, Zagrebelsky M, Weller M, von Elverfeldt D, Mawrin C, Korte M, Dunay IR. Chronic murine toxoplasmosis is defined by subtle changes in neuronal connectivity. *Dis Model Mech*. 2014 Apr;7(4):459-69. doi: 10.1242/dmm.014183. Epub 2014 Feb 13. PMID: 24524910; PMCID: PMC3974456.
120. Parlog A, Schlüter D, Dunay IR. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol*. 2015 Mar;37(3):159-70. doi: 10.1111/pim.12157. PMID: 25376390.
121. Pena HFJ, Ferreira MN, Gennari SM, de Andrade HF Jr, Meireles LR, Galisteo AJ Jr. *Toxoplasma gondii* isolated from a Brazilian patient with rare pulmonary toxoplasmosis has a novel genotype and is closely related to Amazonian isolates. *Parasitol Res*. 2021 Mar; 120(3):1109-1113. doi: 10.1007/s00436-020-07008-4. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33420622.
122. 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. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.020. PMID: 26859275.
123. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0023866. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21957440; PMCID: PMC3177840.
124. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28;463(1-3):3-33. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01272-x. PMID: 12600700.
125. Rehan IF, Mahmoud ME, Salman D, Elnagar A, Salman S, Youssef M, Aziz ARA, Bazh EK, Hesham AE. Sialylated N-glycan profile during acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice. *Sci Rep*. 2020 Mar 2;10(1):3809. doi: 10.1038/s41598-020-60681-4. PMID: 32123198; PMCID: PMC7052212.
126. Remington JS, McLeod R, Wilson CB, Desmonts G. In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. Toxoplasmosis (p. 918-104).
127. Rochais C, Rymer TL, Pillay N. Challenges in Linking Cognition and Survival: A Review. *Front. Ecol. Evol*. 2022 Feb 10:729546. doi: 10.3389/fevo.2022.729546
128. Ruffolo BB. *Toxoplasma gondii* e enteroparasitoses em ratos urbanos capturados em locais de reciclagem de resíduos sólidos na cidade de Londrina, MsC Thesis, Londrina State University, Londrina, 2008 (p- 36).
129. Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *J Neuroendocrinol*. 2009 Mar;21(4):410-4. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01856.x. PMID: 19226349.
130. Sanchez SG, Besteiro S. The pathogenicity and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):3095-3114. doi: 10.1080/21505594.2021.2012346. PMID: 34895084; PMCID: PMC8667916.

131. Santos SVD, Fortuna GLS, Barbosa LM, Meireles LR, Tiago ÉS, Chieffi PP. Evaluation of aversive behavior in *Rattus norvegicus* experimentally infected by two distinct strains of *Toxoplasma gondii* (ME49 and VEG): study of epigenetic markers. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2022 Oct 24;55:e01222022. doi: 10.1590/0037-8682-0122-2022. PMID: 36287471; PMCID: PMC9592110.
132. Shwab EK, Saraf P, Zhu XQ, Zhou DH, McFerrin BM, Ajzenberg D, Schares G, Hammond-Aryee K, van Helden P, Higgins SA, Gerhold RW, Rosenthal BM, Zhao X, Dubey JP, Su C. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul 17;115(29):E6956-E6963. doi: 10.1073/pnas.1722202115. Epub 2018 Jul 2. PMID: 29967142; PMCID: PMC6055184.
133. Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014 Apr;141(4):453-61. doi: 10.1017/S0031182013001844. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24477076.
134. Silva BA, Gross CT, Gräff J. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization. *Learn Mem*. 2016 Sep 15;23(10):544-55. doi: 10.1101/lm.042812.116. PMID: 27634145; PMCID: PMC5026211.
135. Silva LA, Fernandes MD, Machado AS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC, Almeida Vitor RW. Efficacy of sulfadiazine and pyrimetamine for treatment of experimental toxoplasmosis with strains obtained from human cases of congenital disease in Brazil. *Exp Parasitol*. 2019 Jul;202:7-14. doi: 10.1016/j.exppara.2019.05.001. Epub 2019 May 8. PMID: 31077733.
136. Simon S, de Thoisy B, Mercier A, Nacher M, Demar M. Virulence of atypical *Toxoplasma gondii* strains isolated in French Guiana in a murine model. *Parasite*. 2019;26:60. doi: 10.1051/parasite/2019048. Epub 2019 Sep 24. PMID: 31549631; PMCID: PMC6757855.
137. Song J, Kim YK. Animal models for the study of depressive disorder. *CNS Neurosci Ther*. 2021 Jun;27(6):633-642. doi: 10.1111/cns.13622. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33650178; PMCID: PMC8111503.
138. Spruijt BM, van Hooff JA, Gispen WH. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev*. 1992 Jul;72(3):825-52. doi: 10.1152/physrev.1992.72.3.825. PMID: 1320764.
139. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. 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. doi: 10.1073/pnas.1203190109. Epub 2012 Mar 19. PMID: 22431627; PMCID: PMC3326454.
140. Subauste C. Animal models for *Toxoplasma gondii* infection. *Curr Protoc Immunol*. 2012 Feb;Chapter 19:Unit 19.3.1-23. doi: 10.1002/0471142735.im1903s96. PMID: 22314833.

141. Tedla Y, Shibre T, Ali O, Tadele G, Woldeamanuel Y, Asrat D, Aseffa A, Mihret W, Abebe M, Alem A, Medhin G, Habte A. Serum antibodies to *Toxoplasma gondii* and Herpesviridae family viruses in individuals with schizophrenia and bipolar disorder: a case-control study. *Ethiop Med J*. 2011 Jul;49(3):211-20. PMID: 21991754.
142. Tong WH, Pavey C, O'Handley R, Vyas A. Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. *Parasit Vectors*. 2021 Jan 25;14(1):77. doi: 10.1186/s13071-020-04528-x. PMID: 33494777; PMCID: PMC7831251.
143. Tonin AA, Da Silva AS, Thomé GR, Sangoi MB, Oliveira LS, Flores MM, Schetinger MR, Figuera RA, Moresco RN, Camillo G, Vogel FS, Lopes ST. 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. doi: 10.1016/j.prp.2014.04.025. Epub 2014 May 16. PMID: 24951243.
144. Torrey EF, Yolken RH. Schizophrenia and toxoplasmosis. *Schizophr Bull*. 2007 May;33(3):727-8. doi: 10.1093/schbul/sbm026. Epub 2007 Apr 9. PMID: 17426051; PMCID: PMC2526129.
145. Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg Infect Dis*. 2003 Nov;9(11):1375-80. doi: 10.3201/eid0911.030143. PMID: 14725265; PMCID: PMC3035534.
146. Toxodb.org [homepage on the internet]. USA. ToxoDB is a genome and functional genomic database for the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. 2023 [citado 27 mai.2023]. Disponível em: <https://toxodb.org/toxo/app>
147. Toyoda HN, Bezerra. ECM, Dos Santos. SV, Meireles. LR. Avaliação de transtorno depressivo em modelos experimentais de toxoplasmose. Seção de pôster apresentada: II Host Pathogen Interaction meeting 2022; 17-19 out. 2022; São Paulo, SP, Brasil.
148. Vidal JE. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2019 Jan-Dec;18:2325958219867315. doi: 10.1177/2325958219867315. PMID: 31429353; PMCID: PMC6900575.
149. Vital, K. D., Lima, W. G., Pessoa, R. M., Fernandes, S. O., & Cardoso, V. N. Radiofármacos e suas aplicações. *BJHP* [internet]. 2019 [citado 15 dez. 2022]. 1(2), 69–79. Disponível em: <https://bjhp.crfmg.org.br/crfmg/article/view/80>
150. Vitaliano SN, Soares HS, Minervino AH, Santos AL, Werther K, Marvulo MF, Siqueira DB, Pena HF, Soares RM, Su C, Gennari SM. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014 Oct 13;3(3):276-83. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.09.003. PMID: 25426424; PMCID: PMC4241539.
151. 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.

152. 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. doi: 10.1073/pnas.0608310104. Epub 2007 Apr 2. PMID: 17404235; PMCID: PMC1851063. A
153. 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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.06.021. Epub 2007 Aug 1. PMID: 17683872; PMCID: PMC2430144. B
154. 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. doi: 10.14411/fp.2010.011. PMID: 20608470.
155. 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. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.003. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20619261.
156. Wang T, Sun X, Qin W, Zhang X, Wu L, Li Y, Zhou C, Zhou H, He S, Cong H. From inflammatory reactions to neurotransmitter changes: Implications for understanding the neurobehavioral changes in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Behav Brain Res*. 2019 Feb 1;359:737-748. doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.011. Epub 2018 Sep 22. PMID: 30253194.
157. Wang YZ, Chen J, Chu SF, Wang YS, Wang XY, Chen NH, Zhang JT. Improvement of memory in mice and increase of hippocampal excitability in rats by ginsenoside Rg1's metabolites ginsenoside Rh1 and protopanaxatriol. *J Pharmacol Sci*. 2009 Apr;109(4):504-10. doi: 10.1254/jphs.08060fp. PMID: 19372633.
158. Webster JP, McConkey GA. *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. *Folia Parasitol (Praha)*. 2010 Jun;57(2):95-104. doi: 10.14411/fp.2010.012. PMID: 20608471.
159. Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophr Bull*. 2007 May;33(3):752-6. doi: 10.1093/schbul/sbl073. Epub 2007 Jan 11. PMID: 17218613; PMCID: PMC2526137.
160. Wheeler DW, Thompson AJ, Corletto F, Reckless J, Loke JC, Lapaque N, Grant AJ, Mastroeni P, Grainger DJ, Padgett CL, O'Brien JA, Miller NG, Trowsdale J, Lummis SC, Menon DK, Beech JS. Anaesthetic impairment of immune function is mediated via GABA(A) receptors. *PLoS One*. 2011 Feb 24;6(2):e17152. doi: 10.1371/journal.pone.0017152. PMID: 21390329; PMCID: PMC3044756.
161. Wilson RC, Vacek T, Lanier DL, Dewsbury DA. Open-field behavior in muroid rodents. *Behav Biol*. 1976 Aug;17(4):495-506. doi: 10.1016/s0091-6773(76)90901-9. PMID: 788698.
162. Xião 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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.051. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22240252.

163. Xu, M. Yang, Y. Xu, L. Wang, X. Meng, T. Xu, T. Zhang, M. Lu, H. Zhuge, Effect of *Toxoplasma gondii* infection on glucose metabolism in the brain of pregnant rats by [¹⁸F]FDG microPET imaging. *J Radioanal Nucl Chem* 301. 2014. 839–846. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3192-0>

164. Yai LE, Ragozo AM, Soares RM, Pena HF, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Vet Parasitol*. 2009 Jun 10;162(3-4):332-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.03.007. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19375864.

165. Yereli K, Balcioglu 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. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.11.002. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16332418.

166. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug;121(8):799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8. Epub 2014 Mar 1. PMID: 24578174; PMCID: PMC4133642.

Anexos

Anexo 1



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, 11 de Junho de 2018

Ilmo(a)

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

Certificamos que a proposta intitulada "**Caracterização comportamental e alterações fisiológicas de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii***", registrada com o nº **000382A**, sob a responsabilidade de **Profª. Dra. Luciana Regina Meireles J. Ekman** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 01/07/2018 a 01/12/2022							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Camundongo isogênico	Balb/c	8 semanas	20 - 25g	a ser Coletado	75	0	75
Origem: Biotério USP - Biotério da Faculdade de Medicina da USP					TOTAL	75	

Atenciosamente,

p/ Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

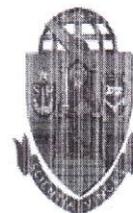
p/ Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

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

Anexo 2



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, 26 de Julho de 2019

Ilmo(a)

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

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "**Caracterização comportamental e alterações fisiológicas de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) infectados com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii***", registrada com o nº **000382A**, sob a responsabilidade de **Profª. Dra. Luciana Regina Meireles J. Ekman** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei n. 11794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n. 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Novo Método / Procedimento: **MicroPet 18 FDG**

Atenciosamente,

Jorge Simão
 Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

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