

PERFIL IMUNOLÓGICO ASSOCIADO A ANÁLISE
COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CEPA
NÃO CLONAL VIRULENTA DE *Toxoplasma gondii*

JULIANA CARDOSO PESSANHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2025

PERFIL IMUNOLÓGICO ASSOCIADO A ANÁLISE
COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CEPA
NÃO CLONAL VIRULENTE DE *Toxoplasma gondii*

JULIANA CARDOSO PESSANHA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Alba Lucínia Peixoto Rangel

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2025

PERFIL IMUNOLÓGICO ASSOCIADO A ANÁLISE
COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CEPA
NÃO CLONAL VIRULENTE DE *Toxoplasma gondii*

JULIANA CARDOSO PESSANHA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 25/02/2025

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Andrea Cristina Veto Arnholdt (Doutora em Ciências Biológicas – Biofísica pela UFRJ) – LBR/UENF



Prof. Dr. Edwards Frazão Teixeira (Doutor em Ciência Animal pela UENF – LBE/FIOCRUZ)



Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia pela UENF) – LBR/UENF



Orientadora: Dr.^a Alba Lucínia Peixoto Rangel (Doutora em Biociências e Biotecnologia pela UENF) – LBR/UENF



AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e maior agradecimento vai para meus pais, Marcelo e Rosângela, por serem meus maiores incentivadores. Obrigada por toda palavra de apoio nos momentos em tudo parecia dar errado e por toda comemoração quando eu chegava à casa com boas notícias. Agradeço também por todo cuidado comigo após os incansáveis plantões do trabalho, seguido de atividades acadêmicas e de pesquisa. Saibam que tudo sempre foi realizado para melhora da nossa qualidade de vida. Também agradeço às minhas irmãs Tatiane e Thais por sempre estarem do meu lado emanando boas vibrações e por entenderem minha ausência ao longo desses dois anos nas reuniões familiares. Agradeço ao Sérgio por sempre estar disposto a ajudar, por me lembrar o quanto sou capaz de “dar conta de tudo”, apoiar minhas decisões e por compreender todos os momentos em que estive distante.

A minha amiga Luiza Ayres, por ter me ensinando muito do que hoje sei e por caminhar comigo em todos os momentos acadêmicos, sempre disposta a ajudar e tornar tudo mais “leve”. E a meus amigos do LBR, Rebeqa, Yuri e Leticia pela troca de conhecimentos, apoio mútuo e pelas conversas que me tiraram boas gargalhadas, tornando esta jornada algo marcante em minha vida.

À minha orientadora, Dr.^a Alba Lucínia, por sua dedicação, paciência e boas orientações ao longo deste percurso. Seu incentivo foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. E aos técnicos do LBR, Rita, Verônica, Núbia, Fernando e Liliane por ajudarem em diversas etapas do meu trabalho, em especial a Juliana Azevedo pelo auxílio e também pela alegria contagiante que revigora nossos dias.

Ao professor Dr. Eulógio Queiroz do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) e aos funcionários do LMPA pela boa receptividade e colaboração na realização de etapas metodológicas.

Aos membros da banca examinadora, pelo tempo dedicado à leitura e avaliação desta dissertação, bem como pelas contribuições enriquecedoras.

A UENF, seus funcionários e ao PGBB pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de título excepcional com ênfase em uma área que sempre me encantou, a IMUNOBIOLOGIA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	15
2.2 Toxoplasmose, inflamação e alterações comportamentais.....	17
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo geral.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1 Delineamento experimental.....	24
5.2 Virulência de Tgcatbr5 em camundongos.....	25
5.3 Coleta de amostras.....	26
5.4 Ensaio de Imunoadsorção Enzimática.....	27
5.5 Dosagem de óxido nítrico.....	28
5.6 Dosagem de citocinas.....	29
5.7 Análise histológica.....	30
5.8 Testes Comportamentais.....	30
5.8.1 Teste de reconhecimento de objetos (TRO).....	31
5.8.2 Teste de suspensão pela cauda (SC)	32
5.8.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	33
5.8.4 Teste do Labirinto em Y (LY).....	34
5.8.5 Teste do Campo Aberto (CA).....	35
5.9 Análises estatísticas.....	36
6. RESULTADOS.....	37
6.1 Virulência de Tgcatbr5 em camundongos.....	37
6.2 Sorologia e avaliação de sinais clínicos na infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	43
6.3 Dosagem de óxido nítrico.....	43
6.4 Resposta imunológica desencadeada por <i>T. gondii</i>	44
6.5 Análise de histologia encefálica.....	48
6.6 Testes comportamentais.....	51
6.6.1 Teste de reconhecimento de objetos.....	51

6.6.2 Teste de suspensão pela cauda	52
6.6.4 Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	53
6.6.4 Teste do Labirinto em Y.....	56
6.6.5 Teste do Campo Aberto.....	58
7. DISCUSSÃO.....	60
8. CONCLUSÃO.....	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário que possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, gerando inflamação no SNC, o que pode contribuir na etiologia ou progressão de doenças neuropsiquiátricas e gerar alterações comportamentais evidentes no modelo murino. Na América do Sul, a diversidade genética de *T. gondii* é alta, coexistindo diferentes genótipos caracterizados como não clonais, comumente relacionados a casos mais graves da doença. Cepas virulentas foram identificadas como prevalentes nas infecções em indivíduos imunocomprometidos. O destaque neste trabalho foi para a infecção pela cepa não clonal virulenta Tgcatbr5, a qual é referência para identificar e caracterizar novos isolados de *T. gondii*, entretanto, poucos são os dados na literatura quanto a interação parasito e hospedeiro, especialmente quanto à sua interação com o sistema nervoso e os impactos no comportamento. Diante deste cenário, o objetivo foi investigar se Tgcatbr5 provoca alterações comportamentais em camundongos C57BL/6 durante a fase aguda da infecção e se estas alterações possuem relação com a resposta imunológica desencadeada, comparando com a cepa clonal ME49 e grupos não infectados. Inicialmente, 32 camundongos C57BL/6 foram utilizados para realização de testes de virulência a fim de estabelecer a concentração ideal de inóculo para a cepa Tgcatbr5. Após esta padronização, 48 camundongos C57BL/6 foram divididos em 3 grupos experimentais: 1) Controle não infectado; 2) Infectado por Tgcatbr5; 3) Infectado por ME49. A infecção ocorreu na concentração de 1×10^3 e 1×10^5 taquizoitos, para as cepas Tgcatbr5 e ME49, respectivamente. A metodologia empregada incluiu a realização de testes comportamentais para análise de parâmetros relacionados a ansiedade (teste do labirinto em cruz elevado e teste de campo aberto), depressão (teste de suspensão pela cauda), aversão ao odor felino (teste do labirinto em Y) e memória (teste de reconhecimento de objetos). Os animais foram eutanasiados após 10 dias de infecção (fase aguda) e amostras séricas foram submetidas à avaliação de soroconversão por ELISA, dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess e dosagem de citocinas por citometria de fluxo. Além disso, parte dos encéfalos foram colhidos para processamento e obtenção de sobrenadante encefálico para dosagem de óxido nítrico e citocinas e parte para avaliação histológica por coloração de H&E em regiões do córtex pré-frontal, complexo amigdalóide e hipocampo. Os resultados revelaram que a infecção pela cepa Tgcatbr5 levou a alterações comportamentais, incluindo hiperlocomoção e

redução de respostas ao medo. Essas alterações parecem estar associadas a uma resposta imunológica intensamente pró-inflamatória, devido a presença de altos níveis de IFN- γ , MCP-1, TNF- α e IL-6 no soro e em sobrenadantes encefálicos. Foi constatada a presença de infiltrado inflamatório no córtex pré-frontal, associado a alta titulação de citocinas e de MCP-1, o que faz da infecção por Tgcatbr5 um fator contribuinte para o desenvolvimento de esquizofrenia, demência e depressão. A padronização do inóculo mostrou que Tgcatbr5 é altamente virulenta, causando óbito inevitável no modelo murino, destacando a importância descoberta de abordagens terapêuticas ligadas ao combate da infecção em indivíduos, principalmente, imunocomprometidos.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan that has the ability to cross the blood-brain barrier, generating inflammation in the CNS, which may contribute to the etiology or progression of neuropsychiatric diseases and generate evident behavioral changes in the murine model. In South America, the genetic diversity of *T. gondii* is high, with different genotypes characterized as non-clonal, commonly related to more severe cases of the disease, coexisting. Virulent strains were identified as prevalent in infections in immunocompromised individuals. The highlight of this work was the infection by the virulent non-clonal strain Tgcatbr5, which is a reference for identifying and characterizing new isolates of *T. gondii*. However, there is little data in the literature regarding the parasite-host interaction, especially regarding its interaction with the nervous system and impacts on behavior. Given this scenario, the objective was to investigate whether Tgcatbr5 causes behavioral changes in C57BL/6 mice during the acute phase of infection and whether these changes are related to the immune response triggered, comparing with the clonal strain ME49 and uninfected groups. Initially, 32 C57BL/6 mice were used to perform virulence tests in order to establish the ideal inoculum concentration for the Tgcatbr5 strain. After this standardization, 48 C57BL/6 mice were divided into 3 experimental groups: 1) Uninfected control; 2) Infected with Tgcatbr5; 3) Infected with ME49. The infection occurred at a concentration of 1×10^3 and 1×10^5 tachyzoites, for the Tgcatbr5 and ME49 strains, respectively. The methodology used included behavioral tests to analyze parameters related to anxiety (elevated plus maze test and open field test), depression (tail suspension test), aversion to feline odor (Y-maze test), and memory (object recognition test). The animals were euthanized after 10 days of infection (acute phase), and serum samples were submitted to seroconversion assessment by ELISA, nitric oxide measurement by the Griess method, and cytokine measurement by flow cytometry. In addition, part of the brains was collected for processing and obtaining brain supernatant for nitric oxide and cytokine measurement, and part for histological evaluation by H&E staining in regions of the prefrontal cortex, amygdaloid complex, and hippocampus. The results revealed that infection with the Tgcatbr5 strain led to behavioral changes, including hyperlocomotion and reduced fear responses. These changes appear to be associated with an intensely pro-inflammatory immune response, due to the presence of high levels of IFN- γ , MCP-1, TNF- α and IL-6 in serum and brain supernatants. The presence of an inflammatory

infiltrate in the prefrontal cortex was observed, associated with high titers of cytokines and MCP-1, which makes Tgcatbr5 infection a contributing factor to the development of schizophrenia, dementia and depression. Standardization of the inoculum showed that Tgcatbr5 is highly virulent, causing inevitable death in the murine model, highlighting the importance of discovering therapeutic approaches linked to combating infection in individuals, especially immunocompromised ones.

1. INTRODUÇÃO

A modulação do comportamento do hospedeiro causada mediante a infecção pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) tem representado o eixo central de diversas pesquisas, visto que já foi correlacionada a presença do parasito no sistema nervoso central (SNC) com a manifestação de distúrbios neuropsiquiátricos em humanos e alterações comportamentais em modelos murinos (SUTTERLAN *et al.*, 2015; XIAO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019; WANA *et al.*, 2023). *T. gondii* causa a toxoplasmose, uma doença crônica, onde as manifestações clínicas e complicações tendem a ocorrer em indivíduos imunossuprimidos, enquanto em imunocompetentes ela é conduzida de forma assintomática (KOCHANOWSKY & KOSHY, 2018; SASAI *et al.*, 2018).

O ciclo de vida do parasito envolve 3 formas infectantes: taquizoitos, bradizoitos e esporozoitos. A infecção por *T. gondii* é caracterizada por uma súbita fase aguda onde há constante replicação dos taquizoitos, posterior supressão pelos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro e seguida de fase crônica persistente na forma de cistos teciduais contendo bradizoitos (DUBEY *et al.*, 1998; MENDEZ & KOSHY, 2017). Esses cistos se desenvolvem em diversos órgãos, no entanto, sua prevalência é notável em locais imunoprivilegiados, como neurônios e células da retina (SIBLEY, 2010).

T. gondii possui como hospedeiro definitivo os felídeos, onde é possível que ele se reproduza de forma sexuada e complete seu ciclo de vida, enquanto os demais animais de sangue quente são os hospedeiros intermediários (ATTIAS *et al.*, 2020). As alterações comportamentais baseiam-se na concepção de tornar o hospedeiro mais suscetível à predação, favorecendo a sobrevivência e propagação do parasito (VYAS *et al.*, 2007; FLEGR, 2013). A presença do parasito, sua localização em determinadas áreas cerebrais e a resposta imunológica mediante a infecção são parâmetros avaliados no que diz respeito a etiologia de alterações comportamentais (MCCONKEY *et al.*, 2013).

A estrutura populacional do parasito é diversificada na América do Sul, em especial no Brasil, com a presença de diferentes genótipos que já mostraram se relacionar com casos mais severos da doença (GILBERT *et al.*, 2008; DUBEY *et al.*,

2021). Análises filogenéticas evidenciaram o isolamento de cepas com genótipos idênticos em diferentes hospedeiros na América do Norte e Europa, estabelecendo três genótipos típicos, Tipo I, II e III, decrescentes no quesito virulência em modelos murinos experimentais. Cepas representativas do tipo I incluem RH e GT1, do tipo II incluem ME49 e PRU e tipo III inclui a VEG (SHWAB *et al.*, 2014; DUBEY *et al.*, 2020; BRITO *et al.*, 2023). A patogenicidade entre as cepas se deve a presença de polimorfismos gênicos, resultando na distinta expressão de componentes celulares como rôptrias, grânulos densos e micronemas, importantes na motilidade e no estabelecimento da infecção intracelular (TAYLOR *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2019).

Um estudo inicial correlacionando o genótipo do parasito com a toxoplasmose humana demonstrou que cepas do tipo I, virulentas, foram encontradas em maior número na toxoplasmose congênita, o que pode se relacionar ao fato da alta parasitemia proveniente destas cepas, aumentando o risco da transmissão via transplacentária e a gravidade ao feto (SIBLEY & HOWE, 1995).

A cepa utilizada no presente estudo é denominada Tgcatbr5 e foi isolada em gatos domésticos no Estado do Paraná, Brasil. Tecidos de gatos naturalmente infectados e positivos para anticorpos anti-*T. gondii* pelo teste de aglutinação modificado (MAT) foram dados como alimento a gatos saudáveis, estes considerados hospedeiros sensíveis a detecção de *T. gondii* em amostras teciduais. Oocistos liberados nas fezes dos gatos infectados experimentalmente foram usados para bioensaio em camundongos Swiss, sendo este o fator determinante da classificação de virulência da cepa isolada. Tgcatbr5 foi considerada virulenta, com os óbitos dos camundongos infectados ocorrendo em até 28 dias após infecção (DUBEY *et al.*, 2004).

Em um estudo publicado por Dubey e colaboradores (2011) acerca de cepas de *T. gondii* isoladas em coelhos no estado de Minas Gerais, Brasil, revelou a presença de TgRabbitBr1, cepa esta que através da caracterização genética utilizando a técnica PCR-RFLP foi considerada não clonal e correspondia 100% a Tgcatbr5. Mesmo apresentando alelos tipo III em vários marcadores, a TgRabbitBr1 foi altamente virulenta. Gatos alimentados com cérebro de coelhos positivos no MAT eliminaram oocistos em suas fezes e estes foram bioensaiados em camundongos Swiss por via oral. Todos os animais morreram de toxoplasmose aguda.

Uma análise filogenética utilizando 46 cepas de *T. gondii* com base em sequências de íntrons as agrupou em 11 haplogrupos distintos. Quatro destes são encontrados quase que exclusivamente na América do Sul. Tgcatbr5 foi incluída no haplogrupo 8, apresentando infectividade por via oral e virulência aguda, de forma comparável à das linhagens tipo I (KHAN *et al.*, 2007). A cepa Tgcatbr5 é empregada como padrão de referência para a análise de novos isolados. No entanto, há escassez de informações na literatura sobre estudos relacionados à farmacologia, imunologia e comportamento. Além disso, já foi constatada a manifestação de comportamentos que induzem ansiedade e comprometimento da memória em camundongos infectados com cepas virulentas (EVAGELISTA *et al.*, 2023). Sendo, portanto, necessário o estudo aprofundado de cepas não clonais virulentas.

Diversas pesquisas têm avaliado alterações comportamentais em modelo murino infectado com cepas de *T. gondii*, entretanto, a maior parte dos trabalhos se limitam ao estudo de cepas de linhagens clonais. Uma série de alterações já foram observadas, com destaque na locomoção, comportamentos depressivos, prejuízo de memória e perda da repulsa inata ao odor do predador (ABDULAI-SAIKU *et al.*, 2017; BOILLAT *et al.*, 2020; TONG *et al.*, 2021). Em evidência, um estudo acerca dos efeitos da infecção crônica pela cepa não clonal TgCkBrRN2 (CK2) de *T. gondii* no modelo murino revelou a presença de comportamento do tipo ansioso e depressivo. Além disso, os animais apresentavam maior número de cistos teciduais cerebrais, infiltrado inflamatório e redução da população de micróglia em comparação com a infecção pela cepa clonal tipo II ME-49 (BRITO *et al.*, 2023). Isto evidencia, portanto, como a infecção por cepas não clonais e a presença do parasito no sistema nervoso possuem potencial para gerar alterações comportamentais significativas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário do filo Apicomplexa capaz de infectar um amplo número de animais, dentre eles os mamíferos. Sua descoberta consta em 1908, quando os pesquisadores Nicolle e Manceuax na Tunísia, Norte da África, observaram a morte de roedores africanos (*Ctenodactylus gundii*). Sua denominação é referência a sua evidenciação no roedor. Ainda no mesmo ano, sua identificação no Brasil foi feita por Splendore ao observá-lo em coelhos (*Orycto lagus cuniculus* (AMENDOEIRA & COSTA, 1999; FERGUSON, 2009).

Em todos os hospedeiros, *T gondii* se reproduz de forma assexuada por endodiogenia, entretanto, seu ciclo de vida se completa no epitélio intestinal de felídeos, seu hospedeiro definitivo, onde os parasitos conseguem reproduzir-se de forma sexuada e, assim, favorecem a sobrevivência da espécie por meio da recombinação gênica. O resultado deste tipo de reprodução é o estágio infectante denominado oocisto, o qual é excretado nas fezes do felídeo. No ambiente, esses oocistos passam pelo processo de esporulação e tornam-se infectantes. Cada oocisto contém dois esporocistos em seu interior, os quais contém quatro esporozoitos cada. A infecção por meio deste estágio de *T. gondii* ocorre através da ingestão de água e alimentos contaminados (DE SOUZA & BELFORT, 2014; ATTIAS *et al.*, 2020; TONG *et al.*, 2021).

Quando ingeridos, os parasitos atravessam o epitélio intestinal, invadem células e se multiplicam rapidamente dentro de vacúolos parasitóforos, causando o posterior rompimento celular e liberação da forma infectante taquizoito no meio externo, livres para invadir novas células e atingir a corrente sanguínea, sendo levado para os demais tecidos do corpo. Todo esse processo invasivo caracteriza a fase aguda da doença e é o momento em que os sinais clínicos podem aparecer, embora a maioria dos indivíduos sejam assintomáticos (DUBEY *et al.*, 1998; MENDEZ & KOSHY, 2017; SANCHEZ & BESTEIRO, 2021). A transmissão via transplacentária ocorre por meio de taquizoitos e é umas das formas mais graves de infecção. A toxoplasmose congênita ocorre quando a mulher tem seu contato primário com o parasito durante a gestação, sendo o primeiro trimestre o momento mais sensível a ocorrência de sequelas ao feto. O mesmo pode apresentar patologias neurológicas e cegueira (MCAULEY, 2014; DEGANICH *et al.*, 2022).

Com a resposta imunológica do hospedeiro, os parasitos adquirem uma nova forma, os bradizoitos, os quais se encontram dentro de cistos teciduais e são a forma de manutenção da infecção no hospedeiro de forma crônica. Eles se caracterizam por um metabolismo reduzido e lenta reprodução (ZHAO & EWALD, 2020). São encontrados principalmente no tecido nervoso, muscular cardíaco e esquelético, e retina. Desta forma, um dos meios de transmissão da doença é pela ingestão de carnes cruas ou mal cozidas contendo cistos teciduais de *T. gondii* (CERUTTI, 2020).

A estrutura populacional de *T. gondii* difere entre os continentes. Os primeiros estudos acerca da diversidade genética do parasito foram baseados no isolamento de cepas em animais e humanos utilizando marcadores microssatélites (MS) ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), principalmente na América do Norte e Europa, onde foi observada a presença de 3 linhagens clonais bem disseminadas, Tipo I, II e III (SIBLEY & HOWE, 1995; SCHWB *et al.*, 2014). A clonalidade indica que a principal forma de reprodução do parasito é a forma assexuada (SU *et al.*, 2003), o que de certa forma foi facilitado pelo consumo de carne *in natura* de nossos ancestrais e o sucesso da infectividade oral.

Embora a toxoplasmose humana seja causada em sua maioria por cepas do tipo II, as cepas do tipo I, virulentas, também representam uma porcentagem da etiologia da doença, sendo observada sua prevalência em relação as cepas tipo III (HOWE *et al.*, 1997). Em indivíduos imunocomprometidos foi observada a prevalência da infecção por cepas tipo I ou portadoras de alelos tipo I (GRIGG *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2005).

Cepas chamadas de não clonais são aquelas que não se enquadram em nenhuma das linhagens clonais definidas e indicam uma ocorrência frequente de recombinações gênicas, gerando diversidade. Utilizando um conjunto de técnicas como RFLP, MS e marcadores de íntrons, SU e colaboradores (2012) agruparam 950 isolados de *T. gondii* coletados em diversos locais do mundo em 15 haplogrupos pertencentes a 6 grupos ancestrais principais. Na América do Sul foram encontradas estirpes que divergem dos demais continentes. Diversos estudos na literatura abordam a notável abundância de isolados de *T. gondii* no hemisfério Sul (GALAL *et al.*, 2019; BESSA *et al.*, 2021; BRITO *et al.*, 2023). Há a ocorrência de cepas que se diferenciam do padrão de expansão observado na linhagem clonal, coexistindo

diferentes genótipos, sem que nenhum seja consideravelmente dominante (SCHWB *et al.*, 2014).

A América do Sul é rica em espécies de felinos selvagens (ANDERSON *et al.*, 2024), o que poderia explicar a frequência de reproduções sexuadas do parasito. O clima tropical, quente e úmido, favorece a esporulação de oocistos e com a abundância de água e o vasto território percorrido por esses animais, a disseminação de *T. gondii* é favorecida. Com o aumento da probabilidade de infecção, se aumenta a chance de coinfeções com diferentes cepas em um mesmo felídeo e o surgimento de novas estirpes (FERREIRA ADE *et al.*, 2006; GALAL *et al.*, 2019).

Carneiro e colaboradores (2013) isolaram e genotiparam 26 cepas de *T. gondii* do sangue periférico de recém-nascidos infectados congenitamente no estado de Minas Gerais, Brasil. Os resultados revelaram que 92% dos isolados foram considerados de virulência intermediária a virulentos no bioensaio em camundongos Swiss e 76% dos recém natos desenvolveram retinocoroidite. Pesquisas que relacionam cepas não clonais com o desenvolvimento de casos mais grave da doença são frequentes na literatura (GILBERT, 2008; MEIRELES *et al.*, 2022; CIFUENTES-GONZÁLEZ *et al.*, 2023).

2.2 Toxoplasmose, inflamação e alterações comportamentais

Múltiplos aspectos foram associados a etiologia das alterações comportamentais na infecção pelo *T. gondii*, dentre eles se tem a carga de cistos teciduais, sua distribuição no encéfalo, alterações no nível de neurotransmissores e respostas imunológicas exacerbadas (XIAO *et al.*, 2016; BOILLATT *et al.*, 2020; MATTA *et al.*, 2021).

O Sistema nervoso central é considerado um local imunoprivilegiado, ou seja, nele as respostas imunológicas devem acontecer de forma branda para que processos inflamatórios nocivos ao tecido não aconteçam. A barreira hematoencefálica, formada pela associação de células endoteliais dos capilares cerebrais e astrócitos, criam uma interface entre o parênquima cerebral e o resto do corpo, com a função de proteger o SNC da entrada de patógenos e de selecionar a entrada e saída de moléculas (FORRESTER *et al.*, 2018; KADRY *et al.*, 2020).

T. gondii apresenta a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Isto tende a gerar potenciais respostas inflamatórias no SNC, e, conseqüentemente, dano tecidual. Os mecanismos envolvidos no transporte do parasito para o SNC incluem a entrada de leucócitos infectados, a penetração direta de taquizoítos e a presença de células endoteliais de revestimento do encéfalo infectadas, promovendo um local de replicação próximo ao parênquima cerebral (KONRADT *et al.*, 2016). A busca entre o equilíbrio da resposta imune cria um ambiente favorável para que *T. gondii* persista de forma crônica no indivíduo (SANA *et al.*, 2022). Desta forma, o SNC se constitui o principal lugar onde o parasito pode ser encontrado na toxoplasmose latente.

Além da resposta imune a nível sistêmico, observam-se respostas a nível local no SNC, com o recrutamento de células da periferia e com a ação de células residentes, como a micróglia e astrócitos (LAING *et al.*, 2020). A presença de processos inflamatórios no SNC está intimamente associada com a incidência de doenças neurodegenerativas (LI *et al.*, 2019). Com isso, a toxoplasmose é considerada um fator de risco na etiologia e progressão de doenças neuropsiquiátricas como depressão, ansiedade, Alzheimer, transtorno bipolar e esquizofrenia (SUTTERLAN *et al.*, 2015; MILLER & RAISON, 2016; XIAO *et al.*, 2018). Já nos modelos animais a presença de *T. gondii* demonstrou levar a redução de comportamentos associados a medo, aumento da atividade exploratória e uma certa preferência ao odor de predadores (TONG *et al.*, 2021).

A neuroinflamação é caracterizada pela elevação de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de citocinas anti-inflamatórias no parênquima cerebral e é um dos pressupostos quanto a alterações comportamentais em humanos infectados e nos modelos experimentais com animais (EYRE *et al.*, 2013). Uma meta-análise acerca do perfil de citocinas em pacientes com depressão revelou aumento dos níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) em relação aos pacientes controles. A IL-6 apresentou atividade anti-neurogênica e TNF- α atividade anti-proliferativa em células progenitoras neurais, mecanismos estes envolvidos no agravamento da fisiopatologia da depressão (DOWLATI *et al.*, 2010). A micróglia, célula residente do SNC e associada a resposta imune, quando ativada por agentes infecciosos, foi demonstrada permanecer ativa por meses, liberando diversos mediadores pró-inflamatórios, o que pode indicar uma ligação entre a entrada de

patógenos no SNC, a presença de inflamação e o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (PATEL, 2013). A neuroinflamação também foi associada ao declínio cognitivo durante o Alzheimer e na doença de Parkinson.

Mediadores inflamatórios como IL-6, interferon γ (IFN- γ) e TNF- α utilizam diferentes recursos para evitar a disseminação do parasito, dentre eles a ativação da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima expressa principalmente por células apresentadoras de antígenos (APC's) e relacionada a inflamação. Ela estimula a degradação de triptofano, componente essencial para replicação do parasito (NAYERI *et al.*, 2021). A limitação de triptofano, em contrapartida, afeta a síntese de melatonina e a produção de serotonina (PATEL, 2013; MILLER & RAISON, 2016; HOU *et al.*, 2017). Quando degradado, o triptofano transforma-se em ácido quinolínico e ácido quinurênico. O ácido quinolínico estimula a liberação de glutamato e impede sua recaptação por astrócitos. O excesso de glutamato a nível extracelular leva a citotoxicidade e se mostrou relacionado com o aumento de comportamentos depressivos (MILLER & RAISON, 2016). De certa forma, pode-se observar que há ligação entre a toxoplasmose e doenças que afetam o SNC.

Um estudo utilizando modelo murino infectado por *T. gondii* acerca da relação entre a presença do parasito e o metabolismo de dopamina no cérebro demonstrou que houve aumento de liberação de dopamina por células dopaminérgicas infectadas (PRANDOVSKY *et al.*, 2011). Curiosamente, maiores concentrações de dopamina estão associadas a comportamentos impulsivos em humanos (FLEGR *et al.*, 2013; TONG *et al.*, 2021).

Um outro neurotransmissor possivelmente envolvido na neuroinflamação é a noradrenalina, pois além do papel de sinalização ela tem atividade na regulação da inflamação. Sua ação suprime a produção de vários fatores pró-inflamatórios por astrócitos e micróglia, principalmente pela inibição do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), que regula positivamente genes associados a esse tipo de resposta (MORI *et al.*, 2002). Sabe-se que *T. gondii* regula negativamente a sinalização noradrenérgica (LAING, 2020). Portanto, esse desbalanço de neurotransmissores e neurodegeneração associada a uma resposta imune exarcebada pode ser o elo da hipótese entre aumento da inflamação no SNC e as alterações comportamentais induzidas.

No SNC, apenas neurônios são hospedeiros de cistos teciduais. Astrócitos infectados conseguem livrar-se da infecção, entretanto neurônios são persistentemente infectados e não possuem a capacidade de eliminar os parasitos (CABRAL *et al.*, 2016; ZHAO & EWALD, 2020). O que poderia explicar o fato de uma robusta resposta imune estar diretamente ligada a neurodegeneração.

A micróglia é ativada onde *T. gondii* apresenta constante replicação, liberando diversas quimiocinas e citocinas como interleucina 1 β (IL-1 β), TNF- α e IFN- γ . Células T CD8+ são um tipo recrutado para resposta contra *T. gondii* no SNC. Elas reconhecem neurônios infectados e agem por meio de sua ação citotóxica, produzindo também IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , todos corroborando para gerar uma resposta do tipo T *helper* 1 (*Th1*) pró-inflamatória (TSITSIKLIS *et al.*, 2019). Além disso, células TCD4+ de perfil T *helper* 2 (*Th2*) também participam atuando na produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), buscando equilíbrio da resposta imune e levando a toxoplasmose latente (SCHLUTER *et al.*, 1997; SANA *et al.*, 2022). Os astrócitos não produzem IFN- γ , mas são essenciais na produção de proteína quimioatratante de monócitos-1 (MCP-1) e IL-1 β , atraindo monócitos periféricos que vão contribuir na resposta pela produção de citocinas pró inflamatórias e pela indução da produção de óxido nítrico (CERUTTI *et al.*, 2020; ZHAO & EWALD, 2020).

A imunidade celular mediada por IFN- γ é fundamental para o controle da infecção. A resposta humoral de forma isolada se mostra incapaz de impedir a reativação de cistos, uma vez que pessoas imunossuprimidas apresentam manifestações clínicas da doença ainda que apresentem título de anticorpos específicos (VIDAL *et al.*, 2005). Foi observado que a depleção de monócitos inflamatórios levou a uma alta carga parasitária e maior índice de óbitos em camundongos infectados. Além disso, foi observada a produção de IL-10, citocina anti-inflamatória, revelando uma característica dupla (BISWAS *et al.*, 2015).

Análises de seções cerebrais de camundongos infectados mostraram que cistos latentes no SNC não estão associados a células imunes, mas que há a presença de focos inflamatórios com parasitos e restos de parasitos associados a células imunes, o que sugere que a principal causa da neuroinflamação induzida é a invasão as células no SNC por *T. gondii* e posteriormente, em caso de reativação de cistos, a liberação de taquízoítas replicativos (MENDEZ & KOSHY, 2017). Desta forma é

fundamental o equilíbrio das respostas e uma resposta imune contínua para que não haja reativação.

Embora todas essas observações tenham sido feitas, os processos que explicam as alterações no comportamento e na neurotransmissão ainda são pouco compreendidos.

De certa forma, a caracterização genética do modelo experimental também se constitui um fator essencial a ser considerado na condução dos estudos. A maior resistência dos camundongos BALB/c à infecção foi anteriormente atribuída a uma resposta imune aprimorada, especialmente mediada pela expressão do gene MHC, levando a níveis diminuídos de citocinas e, assim, controle da inflamação (BROWN *et al.*, 1995). Além disso, foi observado que camundongos BALB/c infectados haviam diminuição da permeabilidade vascular no SNC, diminuindo a infiltração de células imunes periféricas no cérebro em relação aos camundongos C57BL/6 (BERGERSEN *et al.*, 2021). Também foi demonstrado que camundongos BALB/c produzem mais IL10 em resposta ao padrão *Th1* requerido na infecção (SUZUKI *et al.*, 2000). Já os camundongos Swiss, por apresentarem maior variabilidade genética, constituem um modelo experimental relevante para o estudo da toxoplasmose, permitindo considerações mais realistas sobre a diversidade genética presente nas populações naturais. Entretanto, se caracterizaram com resistência variável à infecção experimental (SARAF *et al.*, 2017). Um estudo utilizando oocistos da cepa ME49 revelou maior patogenicidade em camundongos C57BL/6, seguido do Swiss e com menor patogenicidade em BALB/c (DUBEY *et al.*, 2012).

Dentre as linhagens comuns, os C57BL/6 apresentam maior suscetibilidade à doença, com aumento da carga parasitária e da inflamação (JOHNSON *et al.*, 2002; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2020). Em indivíduos imunocomprometidos, a reativação do parasita pode levar ao desenvolvimento de encefalite toxoplásmica. Nesse contexto, a utilização de modelos experimentais que reproduzam essa condição torna-se essencial para o estudo da doença, uma vez que, em indivíduos imunocompetentes, a infecção geralmente permanece assintomática.

3. JUSTIFICATIVA

Ao longo dos anos, variantes genéticas das cepas clonais de *Toxoplasma gondii*, classificadas como cepas não clonais, foram identificadas em grande número no território sul-americano, com ênfase no Brasil. No início dos anos 2000, 37 novas cepas foram isoladas a partir de gatos domésticos, incluindo a cepa Tgcatbr5, que se destacou por ser considerada virulenta em modelo animal. Contudo, a literatura científica referente a estudos comportamentais e imunológicos envolvendo cepas virulentas de *T. gondii* ainda é limitada. Quanto a análise comportamental, já foi observado prejuízos na memória de curto e longo prazo, em camundongos infectados com a cepa TgDgBR2, pertencente à linhagem típica brasileira BRI, a qual apresenta alta virulência (Evangelista *et al.*, 2023). Além disso, já foi encontrada relação entre o aumento do comportamento exploratório e níveis séricos aumentados de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-12 e TNF em animais infectados com *T. gondii*, apontando para uma ligação direta entre o grau de inflamação e ansiedade reduzida (BOILLAT *et al.*, 2020). Infecções por cepas não clonais de *T. gondii* têm sido associadas a casos mais graves da doença em humanos, além de estarem vinculadas a diversas alterações comportamentais em modelos murinos, como sintomas de depressão, hiperlocomoção e déficit cognitivo. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa veio se dedicando ao estudo dos efeitos da infecção por cepas não clonais regionais. A cepa Tgcatbr5 é utilizada como referência para a caracterização de novos isolados de *T. gondii* em razão de sua ampla ocorrência. Contudo, ainda são escassos os dados disponíveis na literatura sobre estudos imunológicos e comportamentais envolvendo este tipo de cepa, especialmente no que se refere à sua interação com o sistema nervoso e os processos comportamentais. Portanto, diante do cenário atual, a investigação da neuroimunomodulação em modelos murinos, a partir da infecção com cepas não clonais virulentas de *T. gondii*, assume extrema importância. Desta forma, este estudo visou proporcionar uma melhor compreensão do papel de cepa virulentas no desenvolvimento de distúrbios neurológicos e, conseqüentemente, das alterações comportamentais observadas nos animais infectados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar se a infecção pela cepa não clonal virulenta Tgcatbr5 é capaz de induzir alterações comportamentais em modelo experimental de camundongos C57BL/6. Adicionalmente, busca-se investigar a possível relação dessas alterações com o perfil de resposta imunológica desencadeada pela infecção.

4.2 Objetivos específicos

- I. Desenvolver um modelo de infecção experimental em camundongos C57BL/6 utilizando a cepa não clonal virulenta de *T. gondii* Tgcatbr5 e a cepa clonal ME49 (Tipo II), tal como em controles não infectados;
- II. Analisar o padrão de resposta imunológica induzido pela cepa infectante através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em amostras séricas e em sobrenadante de tecidos encefálicos, comparando aspectos inflamatórios entre as vias sistêmica e local.
- III. Realizar testes comportamentais padronizados para avaliar a presença de comportamentos associados à depressão, à ansiedade e à hiperatividade, além de investigar a possível ocorrência de déficits cognitivos induzidos pela infecção.
- IV. Analisar cortes histológicos de encéfalos para identificar possíveis focos inflamatórios, correlacionando-os com a produção de óxido nítrico (NO) por células imunológicas e com a dosagem de citocinas, realizando comparações entre os resultados obtidos para as diferentes cepas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental

Um total de 80 camundongos isogênicos C57BL/6 fêmeas com 8 semanas de idade, doados pelo biotério da UENF, foram utilizados no presente estudo. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UENF (protocolo nº 563).

Três análises de virulência em camundongos utilizando Tgcatbr5 foram realizadas, contabilizando 32 animais, que foram divididos em grupos/caixas com 2 camundongos por quantidade de inóculo a ser testada. Detalhes podem ser encontrados no item 5.2

Após as padronizações necessárias, o experimento central foi conduzido com o uso de 48 camundongos que foram divididos em: 1) Controle não infectado; 2) Infectado por cepa clonal ME49; 3) Infectado por cepa não clonal Tgcatbr5. Cada grupo foi composto por 16 animais dispostos em 4 caixas de plástico contendo maravalha autoclavada com 4 camundongos cada. Aqui, as infecções por Tgcatbr5 e ME49 ocorreram via intraperitoneal em uma concentração de 1×10^3 e 1×10^5 taquizoitos, respectivamente, diluídos em solução de salina estéril (PBS 1x), que foram previamente replicados em cultura de *human foreskin fibroblast cells*. No grupo controle foi administrado PBS 1x.

A cepa Tgcatbr5 foi obtida através do Repositório de Recursos de Pesquisa de Biodefesa e Infecções Emergentes (*BEI Resources*) e a cepa ME49 foi cedida pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da UENF.

Todos os animais foram alocados em estantes ventiladas, com livre acesso a água e ração, em salas contendo ciclo claro-escuro de 12h/12h. Os camundongos foram monitorados diariamente e obtiveram pesagens diárias. Todos animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais e posteriormente foram eutanasiados com Uretano (SIGMA) via intraperitoneal com 10 dias pós inoculação (pi) para avaliação de uma fase aguda de infecção, momento em que manifestações

clínicas da doença acontecem e tendo em vista que as análises de virulência demonstraram óbitos naturais após este período. Após a eutanásia, houve a coleta de amostras de sangue e encéfalos para processamento e posteriores etapas metodológicas.

5.2 Virulência de Tgcatbr5 em camundongos

Devido à escassez de informações na literatura acerca da infecção pela cepa Tgcatbr5, fez-se necessário a realização de uma análise de virulência utilizando diferentes concentrações do inóculo em busca de determinar a quantidade adequada de parasitos para realização do modelo experimental de infecção.

Inicialmente, os taquizoitos doados foram recuperados e ampliados em garrafas de cultivo celular contendo *human foreskin fibroblast cells* (HFFC) pré-cultivados em DMEM F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium F12*) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 1% de P/E (penicilina e espretopmicina) e 1% de L-glutamina a 37°C sob 5% de CO₂. Os parasitos foram passados por duas vezes em cultura com intervalo de 4 dias para cada passagem. Posteriormente, foram recolhidos e armazenados em solução crioperservadora contendo 50% de SFB, 30% de DMEM F-12 e 20% de DMSO (Dimetilsulfóxido) em nitrogênio líquido.

As análises de virulência foram divididas em 3 protocolos baseados nos métodos em que os taquizoitos foram utilizados para infecção:

Protocolo 1) O frasco contendo Tgcatbr5 foi descongelado rapidamente em banho maria à 37°C por 1 minuto. Após o descongelamento, os parasitos foram contados e ajustados nas seguintes concentrações: 500, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 taquizoitos a cada 0,5mL. Cada grupo, contendo dois animais, foi infectado com os inóculos de cada concentração, anteriormente citados, via intraperitoneal diluídos em PBS 1x. Os animais foram acompanhados por um período de 14 dias com pesagens diárias. Ao final do experimento, uma coleta de sangue foi realizada para avaliação da soroconversão. No grupo controle foi administrado apenas PBS 1x.

Protocolo 2) Nesta etapa, após o descongelamento de Tgcatbr5, os taquizoitos foram adicionados a meio de cultivo celular contendo uma monocamada de HFFC antes de serem usados para infecção nos animais. Os parasitos permaneceram em cultura por 4 dias antes de serem recolhidos. Desta vez as

concentrações do inóculo provenientes da cultura foram ajustadas para: 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 e 5000 taquizoitos. Cada grupo era composto por 2 animais infectados via intraperitoneal com os taquizoitos diluídos em PBS 1x e no grupo controle foi administrado apenas PBS 1x. Os animais foram acompanhados por 18 dias com pesagens diárias. A coleta de sangue foi realizada para avaliação da soroconversão ao final do experimento, com exceção daqueles animais que apresentavam sintomatologia da doença, onde a coleta foi realizada mediante a observação dos sinais clínicos.

Protocolo 3) Após o descongelamento de Tgcatbr5, os taquizoitos utilizados para infecção foram replicados após 2 passagens em meio de cultivo celular contendo células *HFF*, com intervalo de 4 dias entre as passagens. Os inóculos foram ajustados para as seguintes concentrações: 1000, 10000, 100000 taquizoitos. Cada grupo era composto por 1 animal, que foram acompanhados por 7 dias com pesagens diárias.

Para retirada e quantificação dos taquizoitos em cultura as células foram coletadas com raspador de células de 25cm (KASVI) e o meio foi adicionado a tubo cônico de 14mL e centrifugado a 2300g por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 1mL de meio DMEM F-12. O *pellet* ressuspendido foi submetido a movimentos repetidos com seringa e agulha de calibre 25x0,60mm para lise das células e liberação dos parasitos intracelulares. Uma alíquota de 20ul foi submetida a contagem na câmara de Neubauer e os parasitos quantificados utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de taquizoitos contados}}{\text{Número de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

5.3 Coleta de amostras

Para avaliação da soroconversão, por ELISA, dos animais submetidos ao teste de virulência, foi realizada a coleta sangue periférico pelo plexo retro orbital. Os olhos dos animais foram anestesiados anteriormente com o colírio Anestalcon® (Cloridrato de proximetacaína 5 mg/mL). Após, o sangue foi coletado utilizando pipetas pasteur de vidro e armazenados em microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1000g por 10 minutos e o soro armazenado.

Para detecção de anticorpos IgM, dosagem de óxido nítrico e dosagem de citocinas a nível sistêmico após o ensaio da infecção do experimento central, a coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca ao fim do experimento com a eutanásia dos animais utilizando Uretano via intraperitoneal, com seringa de 1mL e agulha de calibre 25x0,60mm, seguindo as mesmas etapas finais descritas anteriormente.

Para obtenção do sobrenadante encefálico usado para dosagem de óxido nítrico a nível local, os encéfalos foram coletados, cortados com tesoura e macerados com 1mL de tampão de lise RIPA (Triton X-100 1%, Desoxicolato de sódio 1%, SDS 0,1%, aprotinina 1ug/mL, Na₃VO₄ 0,1mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM e Tris-HCL 10mM) utilizando seringa e agulha de calibre 25x0,70mm. Para obtenção do sobrenadante encefálico usado para dosagem de citocinas a nível local, os encéfalos foram coletados, cortados com tesoura e macerados com 500µl de tampão de lise RIPA, anteriormente descrito, associado a 500µl de um coquetel inibidor de protease (SIGMA). As amostras foram centrifugadas a 2300g por 10 minutos e o sobrenadante posteriormente armazenados a -70°C até as respectivas análises.

5.4 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

As amostras séricas colhidas foram submetidas a busca de anticorpos IgM e IgG anti-*T.gondii* para avaliação da soroconversão por ELISA indireto. No estudo de virulência, as amostras foram submetidas à análise de IgM e IgG, enquanto as amostras colhidas no experimento central foram submetidas apenas a detecção de IgM, pois devido ao tempo de infecção a busca por IgG levaria a resultados falso-negativos (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). Em todas as análises foram utilizadas microplacas rígidas com 96 poços previamente sensibilizadas com o lisado proteico da cepa RH de *T. gondii* diluído com Tampão Carbonato-Bicarbonato 0.5M (pH 9.6) em concentração de 10µg/mL por poço, e posteriormente incubadas overnight a 4°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas por três vezes com 200µl da solução de lavagem PBST 0,05% (Phosphate Buffered Saline with Tween 20), sendo cada lavagem desprezada por inversão. Antes de serem adicionadas na placa, as amostras, controles, anticorpos e conjugados foram diluídos com solução diluente (PBST 0,05% + BSA 0,5% (Bovine Serum Albumin)). Para análise de IgM as amostras foram diluídas na concentração de 1:25 e para análise de IgG na

concentração de 1:64. O volume adicionado foi de 100µL por poço em duplicatas e as placas seguiram para incubação por 60 minutos a 37°C.

Posteriormente, as placas foram lavadas por três vezes com a solução de lavagem. Ambos os anticorpos foram diluídos na concentração de 1:1000, adicionados a suas respectivas placas, seguido de nova incubação de 60 minutos à 37°C e posterior etapa de lavagens por três vezes. O anticorpo IgG utilizado foi o α -mouse IgG (Fc) HRP #A2554 (SIGMA) e o IgM foi o Rat anti-mouse IgM #04-6800 (ZYMED).

Posterior a incubação e etapas de lavagem, na placa de busca por IgG, foi adicionada a solução de revelação contendo ABTS (ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico), a qual ficou sob o abrigo da luz e em seguida foi levada para o espectrofotômetro de microplacas *Multiskan Skyhigh* (Thermo Scientific) e lida à 405nm. No entanto, devido ao anticorpo IgM utilizado não ser conjugado a HRP, foi necessária uma etapa extra utilizando o Rat Immunoglobulins-HRP #P0450 (DAKO) diluído na concentração de 1:15000, o qual foi adicionado a placa de busca por IgM, seguindo de nova incubação por 60 minutos a 37°C. Após incubação e posterior etapas de lavagens, foi adicionado a placa a solução de revelação e a mesma seguiu para leitura no mesmo aparelho à 405 nm.

5.5 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada através do método de Griess. Desta forma, após o descongelamento das amostras, foi necessária a etapa de desproteinização utilizando uma solução de metanol e éter na proporção de 3:1, adicionada em quantidades iguais aos soros e sobrenadantes, sendo mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 2300 g a 4°C e o sobrenadante utilizado para busca por NO.

Para a pesquisa de NO foi utilizada uma microplaca rígida de 96 poços, onde foi adicionado 50ul de cada amostra (soros e sobrenadantes) em duplicata. Além das amostras, uma curva padrão em duplicata foi realizada, utilizando diluições seriadas de Nitrito de Sódio (NaNO₂) em tampão de lise RIPA. Em seguida, foram adicionados 50ul da solução de Griess em todas as amostras e na curva padrão, seguido de posterior leitura no espectrofotômetro de microplacas *Multiskan Skyhigh*

(Thermo Scientific) à 570 nm. A solução de Griess é composta pela proporção 1:1 da solução A (2,5 ml ácido fosfórico (H₃PO₄) + 0,5g de sulfanilamida + 47 ml H₂O destilada) e solução B (0,05 g N-1-naftilenodiamina + 50 ml de H₂O destilada).

O método se baseia na quantificação nitrito, metabólito estável do NO, por isso a detecção é considerada indireta. O nitrito na amostra reage com a solução de Griess e a cor gerada é proporcionalmente relacionada a quantidade indireta de NO na amostra (TATSCH *et al.*, 2011; VILLEGAS-RIVERA *et al.*, 2015).

5.6 Dosagem de citocinas

A resposta imunológica desencadeada pela infecção por *T. gondii* foi analisada através da dosagem de citocinas por meio do kit BD *Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse Inflammation* (BD Bioscience), de acordo com as recomendações do fabricante. O kit realizou a detecção simultânea de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interferon gama (IFN- γ), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 12p70 (IL-12p70) e amostras de soro e sobrenadante encefálico.

Para a análise CBA os padrões de citocinas foram diluídos em série (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256) utilizando o diluente de ensaio para construir as curvas de calibração a serem usados para determinar as concentrações de citocinas presentes nas amostras. Em seguida, foi preparado um mix com as esferas de capturas de citocinas utilizando 5 μ l de cada esfera.

As amostras foram descongeladas e partes iguais de cada amostra (25 μ l) e mix de esferas (25 μ l) foram adicionados a um microtubo. Da mesma maneira, o mix de esferas também foi adicionado a cada padrão diluído e controle negativo, sendo este composto somente por diluente de ensaio. Além disso, 25 μ l do reagente de detecção PE foi adicionado a cada microtubo. As amostras e padrões foram encubados por 2h em temperatura ambiente e protegidos da luz.

Em seguida, foi realizada a etapa de lavagem onde 500 μ l de tampão de lavagem foi adicionado a cada microtubo e este posteriormente centrifugado a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 300 μ l de tampão de lavagem foi utilizado para ressuspender cada amostra e padrão. Procedeu-se a leitura no citômetro de fluxo BD FACSymphony A1 com 4 lasers (BD Biosciences). A intensidade da fluorescência emitida por cada citocina foi o parâmetro para indicar a

concentração, a qual foi expressa em pg/mL, usando o *CBA Analysis Software* 1.1.15

5.7 Análise histológica

Após a eutanásia e coleta de sangue, os animais destinados a análise por histologia encefálica foram submetidos a perfusão cardíaca com 20 mL de PBS a 4 °C, seguido de 20mL de paraformoldeído a 4% tamponado a fim de remover vestígios de sangue do tecido cerebral. Os encéfalos foram fixados em paraformoldeído a 10% tamponado por 48h e em seguida submetidos a clivagem e inclusão em cassetes histológicos que seguiram para processamento a fim de desidratar o tecido e impregnar parafina para conferir rigidez e possibilitar os cortes.

Os encéfalos desidratados e impregnados foram incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes histológicos de 5µm de espessura no micrótomo nas regiões de córtex pré-frontal, complexo amigdalóide e hipocampo. Em seguida, as lâminas contendo os cortes seguiram para desparafinação utilizando banhos de xilol por 15 minutos e reidratações progressivas utilizando diferentes concentrações decrescentes de álcool por 1 minuto cada (100%, 95%, 80%, 70%), seguido da imersão em água destilada por 1 minuto.

A coloração utilizada foi a técnica de hematoxilina e eosina de Harris (HE) e se inicia pela imersão das lâminas em hematoxilina por 3 minutos, seguido da lavagem em água corrente por 10 minutos. Em seguida as lâminas ficam imersas na eosina por 5 minutos, seguida da imersão de 1 minuto em água destilada para retirar o excesso de corante.

Em sequência as lâminas passam por uma série de desidratação do tecido utilizando imersão em quantidades crescentes de álcool (70%, 80%, 95%, 100%) por 1 minuto cada e clarificação por imersão em xilol.

Após a secagem das lâminas foi realizada a montagem, que consiste em cobrir o tecido com uma lamínula de vidro, fixando-a com um bálsamo. As lâminas foram visualizadas em microscopia óptica (Nikon AFX) com as objetivas de 10x e 40x e foram avaliadas quanto a presença de infiltrado de células.

5.8 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados nos dias 7, 8 e 9 pi e foram compostos por: Teste de Campo Aberto, Teste de Labirinto em Cruz Elevado, Teste do Labirinto em Y, Teste de Suspensão pela cauda e Teste de reconhecimento de objetos. Cada teste foi realizado por quatro animais, sendo um por caixa. Apenas na realização dos testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado que houve repetição de animais para avaliação dos resultados em conjunto. Na figura 1 é possível observar a cronologia da experimentação.

Animal	Dia 07 pi	Dia 08 pi	Dia 09 pi
	Habituação TRO	Dia 01 TRO	Dia 02 TRO
		SC	
		LCE	CA
		LY treino	LY

Figura 1. Desenho experimental em ordem cronológica dos testes comportamentais realizados. No dia 07 pós-inoculação (pi) foi realizada a habituação do teste de reconhecimento de objetos (TRO). No dia 08 pi foi realizado o TRO com 2 objetos idênticos, o teste de Suspensão pela cauda (SC), o teste Labirinto em cruz elevado (LCE) e o treino do Labirinto em Y (LY). No dia 09 pi foi realizado o TRO com 1 objeto igual e 1 diferente, o teste Campo aberto (CA) e o teste do LY.

5.8.1 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (TRO) é comumente utilizado para investigação de aspectos relacionados à memória do animal e baseia-se no princípio da propensão inata do animal em explorar aquilo que é considerado novo (LUEPTOW *et al.*, 2017). Para isso, foi utilizada caixa quadrada de campo aberto na cor branca para contrastar com a cor do animal com dimensões de 30cm de comprimento x 20cm de largura x 20cm de altura. No primeiro dia, os animais foram aclimatados à caixa vazia por 5 minutos. No dia seguinte, eles foram colocados no campo com dois objetos idênticos e deixados para explorar o ambiente por 10 minutos. Após 24 horas, os camundongos foram colocados de volta no campo aberto com o objeto familiar e um objeto novo, sendo deixados novamente por 10 minutos. Os objetos utilizados foram de tamanho apropriado para exploração. No dia

01 foram utilizados 2 blocos de LEGO e no dia 02 foi utilizado 1 bloco de LEGO e 1 tampa de garrafa de tamanho semelhante (Figura 2).

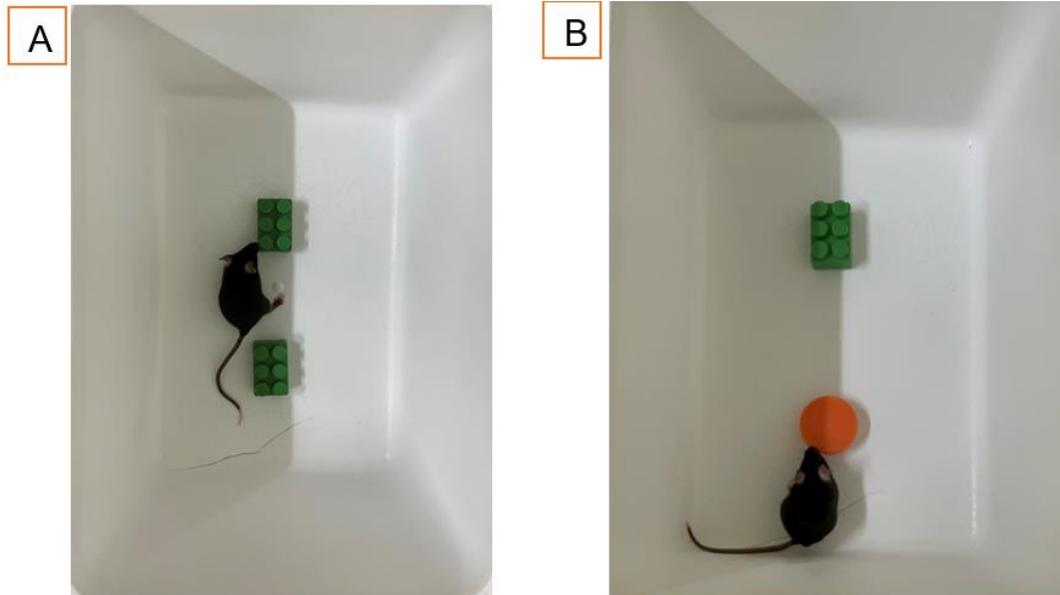


Figura 2. Aparato e objetos utilizados para realização do TRO. (A) Camundongo no dia 01 do experimento explorando 2 objetos idênticos. (B) Camundongo no dia 02 do experimento explorando 2 objetos distintos.

Foi registrado o tempo de exploração no objeto familiar e novo. O método se baseia em contabilizar os primeiros cinco minutos ou até o animal cumprir o tempo mínimo de exploração (20 segundos).

5.8.2 Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda (SC) é usado para avaliar a presença de comportamentos do tipo depressivo e se baseia no princípio de que quando suspensos, após os movimentos iniciais de fuga, os animais tendem a atingir uma postura imóvel, ao observar o estresse inescapável. Desta forma, o aumento do tempo de imobilidade pode indicar um comportamento depressivo (CAN *et al.*, 2012).

Para este, foram utilizadas gaiolas de plástico com 30cm de comprimento x 20cm de largura x 13cm de altura, dispostas verticalmente e adaptadas com ganchos de metal centralmente na parte superior, simulando um instrumento de suspensão. Cada animal foi preso por meio de sua cauda, com auxílio de fita microporosa (Fig 3) e mantidos pendurados por 6 minutos, sendo contabilizados os

4 minutos finais. Foram avaliados o tempo de imobilidade e mobilidade de cada animal e contagem de bolos fecais.



Figura 3. Camundongos suspensos pela cauda com fita microporosa para realização do teste de SC.

5.8.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) avalia comportamentos do tipo ansioso em animais. Basicamente os animais de forma inata são propensos a permanecerem em espaços fechados em relação a espaços abertos, portanto, a avaliação ocorre pela relação entre o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados, além de comportamentos considerados parâmetros de risco, como *headdippings*, que são movimentos exploratórios em que o animal ultrapassa a cabeça do tablado do braço aberto e, espreitas, que é quando o animal se estende com as patas dianteiras sem retirar suas patas traseiras do lugar, voltando em seguida à posição original (KOMADA *et al.*, 2008; HIMANSHU *et al.*, 2020).

Para este teste foi utilizado uma estrutura de madeira contendo dois braços fechados e dois braços abertos dispostos de forma cruzada, ambos com 50cm x 10cm de dimensão. Os braços fechados possuem uma parede de 40cm e o aparato foi elevado a 50cm do solo. Cada animal foi colocado na região central e teve a liberdade de explorar o labirinto por 5 minutos. Foram contabilizados o número de vezes que o animal entrou em cada braço, seu tempo de permanência neles, número de *headdippings* e espreitas.



Figura 4. Camundongo caminhando no aparato em direção ao braço aberto durante a realização do teste de LCE.

5.8.4 Teste do Labirinto em Y

Para o teste do Labirinto em Y (LY) foi utilizada uma plataforma de madeira com formato de Y, que possui três braços idênticos com 35cm de largura, 5cm de espessura e 10cm de altura. Embora seja amplamente utilizado para avaliação de memória a curto prazo, se baseando no princípio de que o animal tem a tendência de entrar em áreas não visitadas anteriormente (KRAEUTER *et al.*, 2019), o LY também é utilizado para avaliar o efeito da infecção na aversão de roedores ao odor do predador, uma vez que a aversão é algo inato de forma a diminuir seu risco de predação.

Aqui, o teste foi dividido em duas fases realizadas em dois dias consecutivos, de acordo com a metodologia descrita por Bezerra e colaboradores (2019). A primeira fase consistiu em um treinamento onde o animal permaneceu em uma área de contenção do aparato por 2 minutos e depois foi liberado para familiarização por 5 minutos. A segunda fase, 24 horas depois, consistiu na mesma metodologia, entretanto foi adicionado em cada braço lateral um estímulo olfativo, sendo o estímulo neutro composto por 1g de sílica e o estímulo de predador composto por

gaze com 1mL de urina pura de gato, ambos dentro de caixas pequenas de plástico perfuradas. Os parâmetros avaliados foram número de entradas e tempo de permanência em cada braço.



Figura 5. Camundongo no braço contendo sílica, realizando o teste do LY.

5.8.5 Teste do Campo Aberto

O teste de campo aberto (CA) é amplamente utilizado para avaliar atividade locomotora/exploração e comportamentos relacionados à ansiedade (HIMANSHU *et al.*, 2020). Para isso, foi utilizada uma caixa quadrada, medindo 40cm x 40cm, com cores diferentes na face interna e externa, sendo preto e branco respectivamente, de forma que houvesse contraste durante a filmagem. Cada animal foi colocado no centro da arena e teve 10 minutos para explorar o ambiente. Durante o teste o único ponto de iluminação foi de uma lâmpada incidindo luz vermelha sob o aparato. Foram avaliados os seguintes tópicos: Distância total percorrida pelo animal, distância percorrida no centro da caixa e o registro de bolos fecais. O rasteio da distância percorrida foi analisado utilizando o software *Ethovision*.



Figura 6. Camundongo no aparato realizando o teste comportamental de campo aberto.

As filmagens de todos os testes foram realizadas utilizando o *smartphone iphone 13 pro max*. A cada animal submetido aos testes, os aparatos eram higienizados com álcool a 10% para que odores não interferissem no comportamento do animal avaliado em seguida.

5.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por *one-away ANOVA*, seguido pelo teste *post-hoc* de *Tukey-Kramer* para diferenças entre mais de 2 grupos e pelo teste *t* de *Student* para diferenças entre quaisquer 2 grupos. Para todas as análises, o nível de significância assumido foi de valores iguais ou menores 0,05 ($p \leq 0,05$). Todos os gráficos e estatísticas foram realizados no *software GraphPadPrism 8.0*.

6. RESULTADOS

6.1 Virulência de Tgcatbr5 em camundongos

Durante a experimentação utilizando como inóculo taquizoitos provenientes diretamente do frasco descongelado (Protocolo 1) foi observado 100% de sobrevivência dos animais. Além disso, não foram observados sinais clínicos da toxoplasmose e houve aumento gradual de peso conforme indicado na figura 7C, indicando que os animais continuavam saudáveis. Foi possível observar na figura 7A-B que os animais não apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, o que sugere que não houve a infecção.

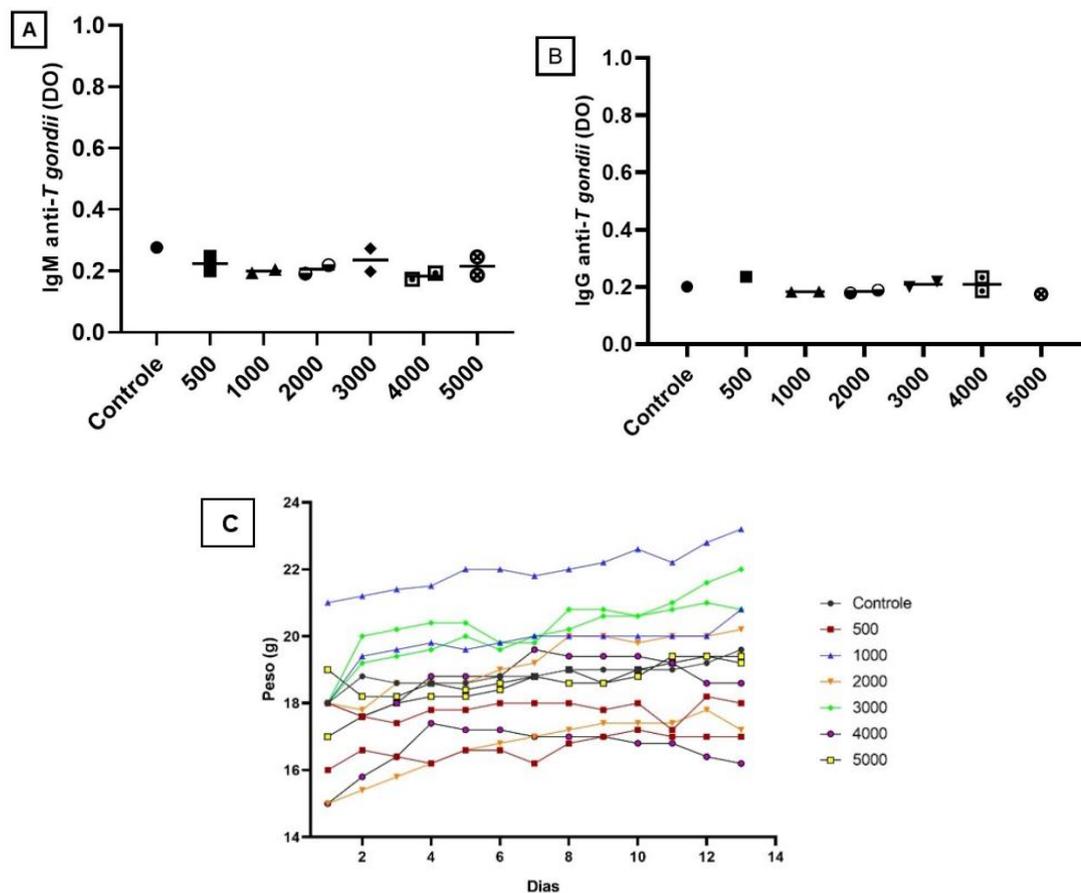


Figura 7. Acompanhamento clínico dos animais infectados com taquizoitos provenientes de frasco descongelado (Protocolo 1). **(A)** Detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii*. **Cut-off: 0,314.** **(B)** Detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii*. **Cut-off: 0,256.** **(C)** Variação de peso ao longo dos dias.

Na segunda fase da experimentação, utilizando taquizoitos provenientes de uma passagem em meio de cultivo celular (Protocolo 2) foi obtido um dado de 64% de óbitos até o dia 18 pi. Na figura 8A é possível observar que durante o acompanhamento clínico, os animais infectados apresentaram perda de peso

significativa, com média de -3g do início ao fim do experimento, enquanto o grupo controle obteve em média um aumento de 2,4g do peso corporal. Na figura 8B se tem o detalhamento acerca da variação de peso corporal e início da manifestação de sinais clínicos da toxoplasmose. Os animais apresentaram piloereção e letargia conforme observado na figura 9.

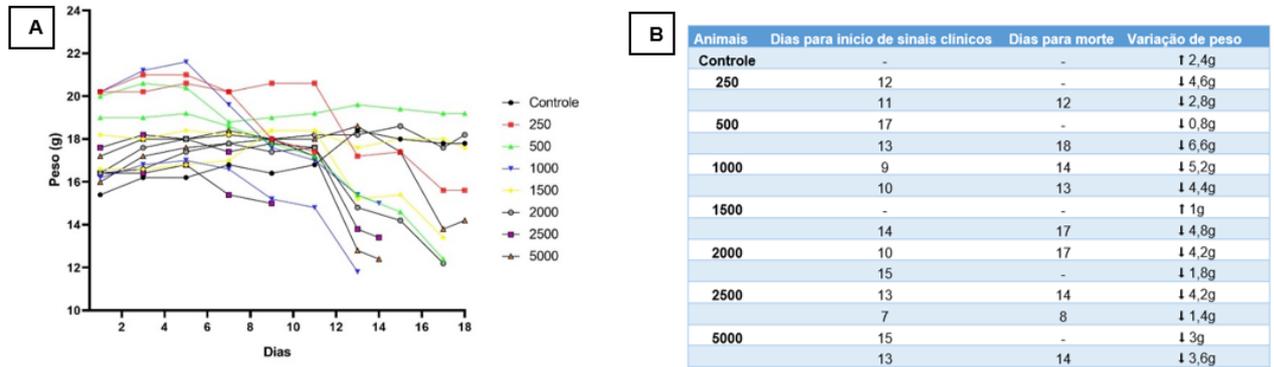


Figura 8. Acompanhamento clínico dos animais infectados com taquizoítos provenientes de uma passagem em cultura celular (Protocolo 2). **(A)** Variação de peso ao longo dos dias. **(B)** Variação de peso, início dos sinais clínicos de infecção e dias para morte precoce ocorrida nos animais infectados, anterior ao fim da experimentação.



Figura 9. Animal infectado com Tgcatbr5 apresentando piloereção.

Na figura 8 pôde-se observar que os 2 animais infectados com 250 taquizoítos apresentaram sinais clínicos em períodos semelhantes, entretanto apenas um veio a óbito (12 dias) antes do fim da experimentação. Ambos apresentaram anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Nos animais infectados com 500 taquizoítos apenas 1 teve o óbito precoce (18 dias), e a sintomatologia ocorreu em períodos distintos (13 e 17 dias). Enquanto o animal que veio a óbito apresentou anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*, o animal sobrevivente apresentou apenas anticorpos IgG. Enquanto isso, ambos

animais infectados com 1000 taquizoitos faleceram (13 e 14 dias) e manifestaram sintomas em um mesmo período (9 e 10 dias), apresentando homogeneidade da infecção e com amostras IgM e IgG anti-*T. gondii* positivas (Figura 11).

Dentre os dois animais infectados com 1500 taquizoitos, apenas um apresentou sinais clínicos (14 dias), veio a óbito (17 dias) e apresentou soropositividade. O outro animal apresentou ganho de peso (1g), sem sinais clínicos da doença e sem soropositividade. Os animais infectados com 2000 taquizoitos apresentaram perda de peso e sinais clínicos da doença (10 e 15 dias). No entanto, apenas um animal veio a óbito (17 dias) durante o tempo de acompanhamento e apresentou soropositividade contra *T. gondii*. Entre os animais infectados por 2500 taquizoitos pode-se observar um óbito repentino com 8 dias de infecção, impossibilitando que fosse realizada a coleta de sangue para avaliação da soroconversão, entretanto se observa na figura 10 a presença de taquizoitos em macerado de pulmão do mesmo animal, confirmando a infecção. O outro animal infectado com 2500 taquizoitos apresentou soropositividade para IgM e IgG e também veio a óbito (14 dias). Podemos observar semelhança na infecção com essa quantidade de inóculo, quando, ao analisar a figura 8B, percebemos o intervalo de 1 dia entre início dos sinais clínicos e morte. Finalizando esta etapa, se tem os animais infectados com 5000 taquizoitos, ambos apresentando sinais clínicos da doença (13 e 15 dias) e soropositividade, mas com apenas um óbito (14 dias) durante o experimento.



Figura 10. Microscopia óptica (aumento de 400x) de macerado pulmonar de camundongo infectado com 2500 taquizoitos, provenientes de uma passagem em cultura celular. O animal veio à óbito com 8 dias pi.

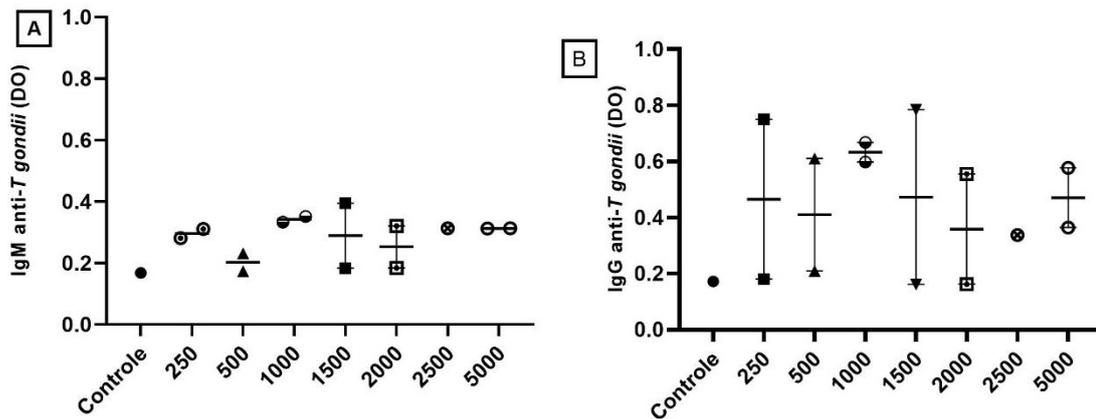


Figura 11. Avaliação da soroconversão dos animais infectados com taquizoítos provenientes de uma passagem em cultura celular (Protocolo 2) **(A)** Detecção de anticorpos IgM anti-*T.gondii*. **Cut-off: 0,189.** **(B)** Detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii*. **Cut-off: 0,199.**

É importante ressaltar que animal infectado com 250 taquizoítos que permaneceu vivo se manteve com piloereção e letargia até o dia 30 pi, quando veio a óbito naturalmente. Os animais infectados com 500, 2000 e 5000 taquizoítos que permaneceram vivos começaram a apresentar melhora dos sintomas com cerca de 30 dias pi, indicando controle da infecção de Tgcatbr5 pelo sistema imune, enquanto o animal infectado com 1500 taquizoítos que permaneceu vivo se manteve sempre saudável.

Com cerca de 50 dias pi, os animais infectados com 500, 2000 e 5000 taquizoítos apresentaram novamente piloereção e letargia, indicando reativação da infecção. Com 60 dias pi, o animal infectado com 5000 taquizoítos veio a óbito. Desta forma, para que fosse possível novas avaliações, os animais sobreviventes foram sacrificados devido a presença de sinais clínicos de toxoplasmose. Os animais foram eutanasiados na câmara de CO₂ e foram realizadas coleta de sangue por punção cardíaca para realização de um novo teste de ELISA. Além disso, foram coletados cérebro e pulmão, que foram macerados em 1 mL de PBS 1x por órgão, utilizando movimentos repetidos com seringa e agulha de calibre 25x0,70mm. A busca por parasitos foi realizada por microscopia ótica (Nikon AFX).

Na figura 12 é possível observar grande quantidade de anticorpos IgG anti-*T.gondii* no animal infectado com 2000 taquizoítos, o qual no ELISA inicial, com 18 dias pi, não havia soroconvertido. Além disso, é possível observar a presença de cisto tecidual de *T. gondii* (**Figura 13**) encontrado no macerado encefálico deste mesmo animal. O animal infectado com 500 taquizoítos não apresentou

soropositividade neste novo teste de ELISA, entretanto, também foi encontrado em seu encéfalo, cisto tecidual (**Figura 14**). Em contrapartida, o animal sobrevivente infectado com 1500 taquizoitos não apresentou soropositividade e nem foi encontrado cistos teciduais no seu macerado encefálico, indicando que de fato a infecção não ocorreu neste animal. Não foram encontrados parasitos no pulmão em nenhum dos animais, provavelmente devido ao tempo de infecção.

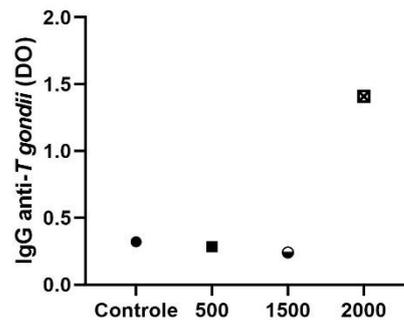


Figura 12. Detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* dos animais que permaneceram vivos após fim dos testes de virulência. **Cut-off: 0,461.**

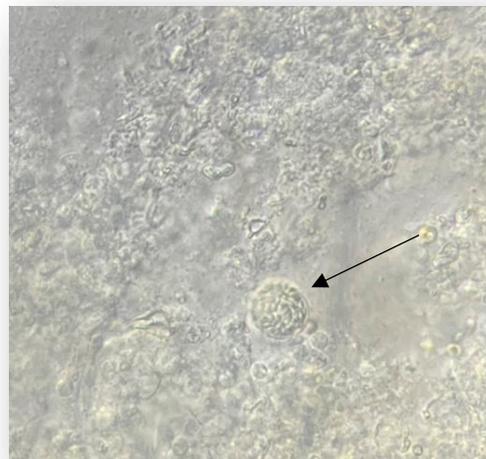


Figura 13. Cisto de *Toxoplasma gondii* em macerado cerebral de camundongo infectado com 2000 taquizoitos da cepa Tgcatbr5 detectado por microscopia óptica com aumento de 400x.

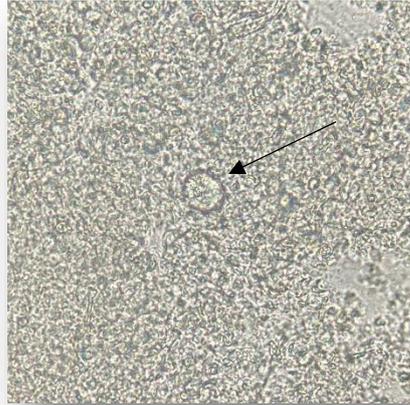


Figura 14. Cisto de *Toxoplasma gondii* em macerado cerebral de camundongo infectado com 500 taquizoítos da cepa Tgcatbr5 detectado por microscopia óptica com aumento de 400x.

Na Figura 15A é possível observar dados tabulados referente a terceira experimentação do teste de virulência de Tgcatbr5, desta vez, utilizando taquizoítos após duas passagens em meio de cultivo celular (Protocolo 3). Este teste de virulência variou de 1000 a 100000 taquizoítos por inóculo. Percebe-se que o animal infectado com 1000 taquizoítos foi a óbito mais precocemente que no experimento anterior. Todos os animais apresentaram sinais clínicos da doença, e apresentaram perda de peso ao longo dos dias conforme observado na figura 15B. Além disso, foram a óbito de maneira repentina, impedindo que fosse realizada coleta de sangue para avaliação da soroconversão.

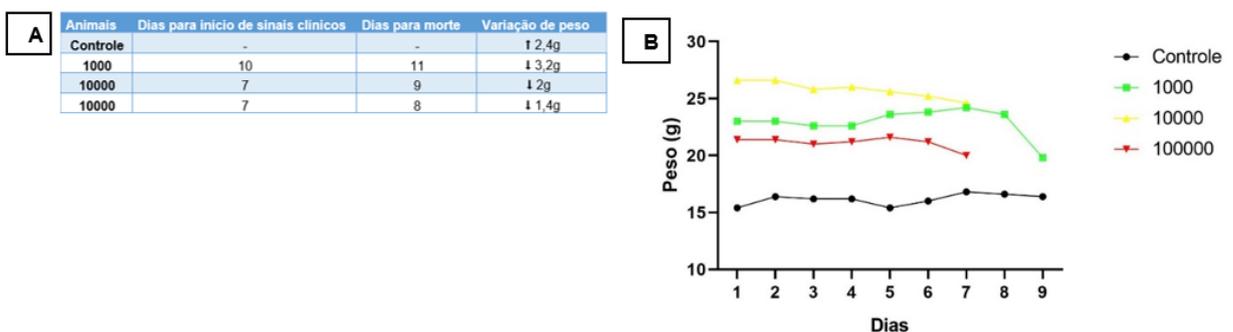


Figura 15. Evolução clínica dos animais infectados com taquizoítos após duas passagens em cultura celular (Protocolo 3) **A)** Variação de peso, início dos sinais clínicos de infecção e morte nos animais. **B)** Variação do peso ao longo dos dias.

Em conclusão, o inóculo ideal estabelecido para o experimento central foi de 1000 taquizoítos provenientes de uma passagem em meio de cultivo celular (Protocolo 2).

6.2 Sorologia e avaliação de sinais clínicos na infecção por *Toxoplasma gondii*

Os animais pertencentes ao experimento central foram eutanasiados com 10 dias pi e amostras séricas colhidas foram utilizadas para avaliação da soroconversão. Além disso, foram realizadas pesagens diárias apenas até o 7º dia pi, pois os testes comportamentais foram realizados nos dias 8 e 9 pi, e a manipulação dos animais para pesagem poderia gerar estresse. Também foram feitas observações quanto ao aparecimento de sinais clínicos da infecção. Na figura 16A é possível observar que os animais apresentaram ganho de peso até o dia 5 pi, entretanto a partir do dia 7 pi, o gráfico é sugestivo a início de um processo de redução de peso nos animais infectados pelas cepas ME49 e Tgcatbr5, enquanto o controle se manteve estável. Até o 7º dia pi não foram observados piloereção e letargia. Na figura 16B é possível avaliar a presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Não foram observados títulos de anticorpos significativos estatisticamente ($p > 0,05$) na infecção pelas cepas ME49 e Tgcatbr5 em comparação ao grupo controle, e apenas 6% dos animais infectados por Tgcatbr5 e 12% dos animais infectados por ME49 foram considerados positivos nesta análise.

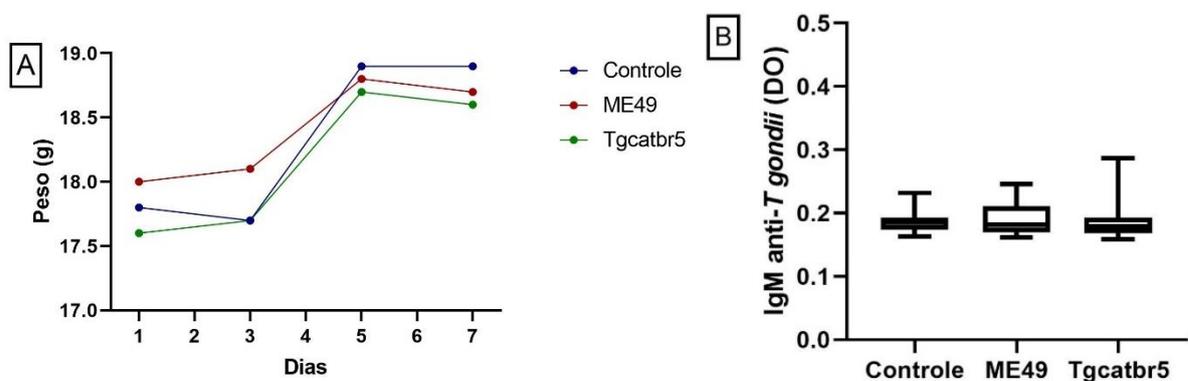


Figura 16. Acompanhamento clínico dos animais avaliados quanto ao experimento central. **(A)** Avaliação de peso corporal durante 7 dias pi. **(B)** Detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* por ELISA. **Cut-off: 0,244.** As barras representam a média e o erro padrão da média ($M \pm SEM$).

6.3 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de NO foi realizada pelo método de Griess, a figura 17 traz os resultados acerca desta análise pela quantificação de nitrito ($\mu\text{M}/\text{mM}$) e, assim, quantificação de NO indiretamente. A figura 17A exhibe os resultados encontrados no soro sanguíneo e em 17B os resultados encontrados no sobrenadante encefálico.

Podemos observar valores negativos nos três grupos, os quais foram obtidos após a inserção das absorvâncias na equação da reta para determinação dos resultados, o que infere que não houve produção de NO pelos animais controle e nem pelos animais infectados pelas cepas de *T. gondii* em ambas amostras. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

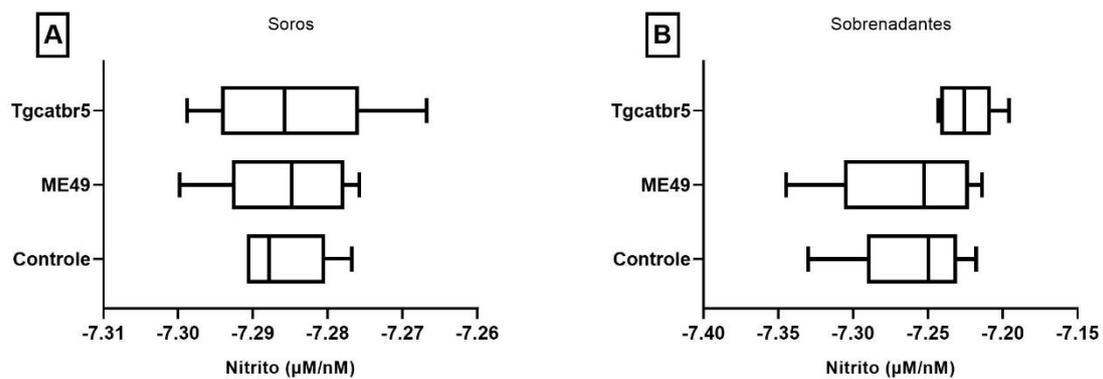


Figura 17. Dosagem de NO indireto em animais controle não infectados e animais infectados pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5. **(A)** Dosagem de nitrito em amostras de soro. **(B)** Dosagem de nitrito em sobrenadantes de macerado encefálico. As barras representam a média e se estendem aos valores mínimos e máximos; $p < 0,05$.

6.4 Resposta imunológica desencadeada por *T. gondii*

Buscando investigar uma possível relação direta entre a resposta imunológica desencadeada pela infecção por *T. gondii* e alterações no comportamento animal, foi avaliado o nível de produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória secretadas tanto a nível sistêmico, em amostras de soro, quanto a nível local, em amostras de sobrenadante encefálico, após 10 dias de infecção. Foi observado um padrão de resposta *Th1* típica em ambos grupos experimentais, infectado por ME49 e infectado por Tgcatbr5, entretanto a intensidade de respostas se mostrou diferente, onde observamos concentrações maiores de todas as citocinas avaliadas no grupo infectado por Tgcatbr5.

Níveis exorbitantes de IFN- γ foram encontrados em amostras séricas de animais infectados com Tgcatbr5, sendo significativamente maiores em relação ao grupo controle ($p=0,0134$). Quando comparamos a produção de IFN- γ entre as cepas observamos que não houve diferença estatística, possivelmente devido à dispersão de dados de alguns animais infectados por ME49, entretanto, ME49

também induziu maior produção que o grupo controle, apesar de não apresentar significância estatística. (Figura 18A). A concentração de IFN- γ também foi significativamente maior no grupo infectado por Tgcatbr5 em relação ao grupo controle ($p=0,0406$) em amostras de sobrenadante encefálico, demonstrando que a resposta imunológica a nível local também estava com padrões pró-inflamatórios (Figura 18B). A produção pelos grupos controle e ME49 não foram significantes.

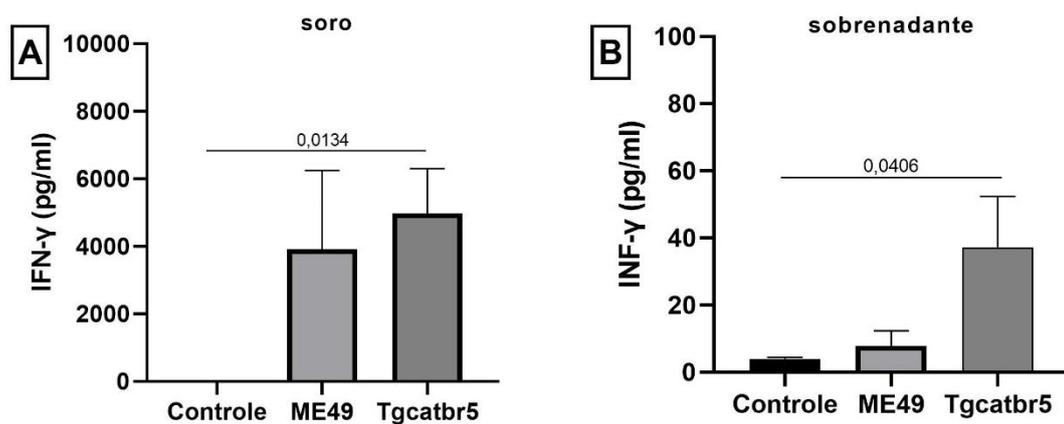


Figura 18. Concentrações em pg/ml de IFN- γ após 10 dias de infecção em camundongos controle não infectados, infectados por ME49 e infectados por Tgcatbr5. **(A)** Níveis de IFN- γ em amostras de soro. **(B)** Níveis de IFN- γ em amostras de sobrenadante encefálico. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$). As barras horizontais em A e B representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$) no teste *t* de Student.

A produção de TNF também foi significativamente aumentada no soro de animais infectados com Tgcatbr5 comparado ao controle ($p=0,0277$) (Figura 19A), assim como é observada maior produção em relação a ME49 e ME49 comparado ao controle, mas ambos sem diferença estatística significativa. A mesma resposta não foi encontrada a nível local, pois se observa uma produção basal no sobrenadante encefálico em todos os três grupos analisados (figura 19B).

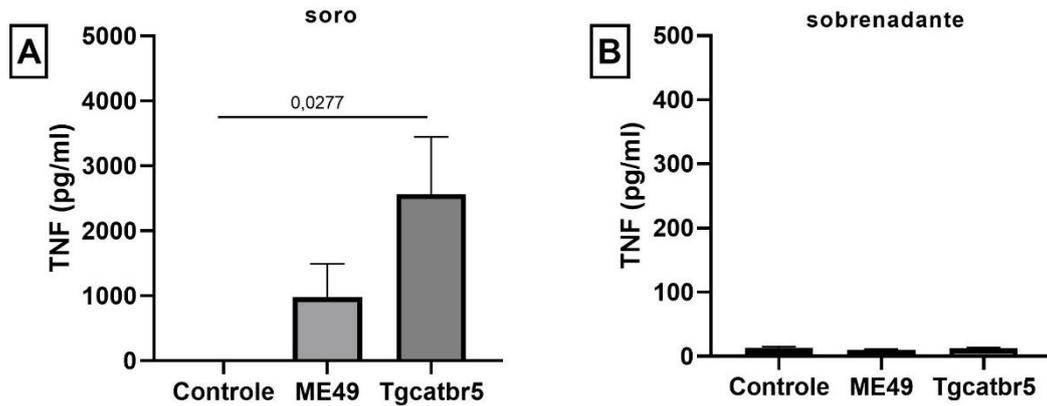


Figura 19. Concentrações em pg/ml de TNF após 10 dias de infecção em camundongos controle não infectados, infectados por ME49 e infectados por Tgcatbr5. **(A)** Níveis de TNF em amostras de soro. **(B)** Níveis de TNF em amostras de sobrenadante encefálico. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$). A barra horizontal em A representa diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$) no teste *t* de Student.

Em relação a produção da citocina pró-inflamatória IL-12, no período de 10 dias pi, não foram encontradas concentrações significativas nas amostras de soro e sobrenadante encefálico analisadas em todos os grupos (Figura 20A-B).

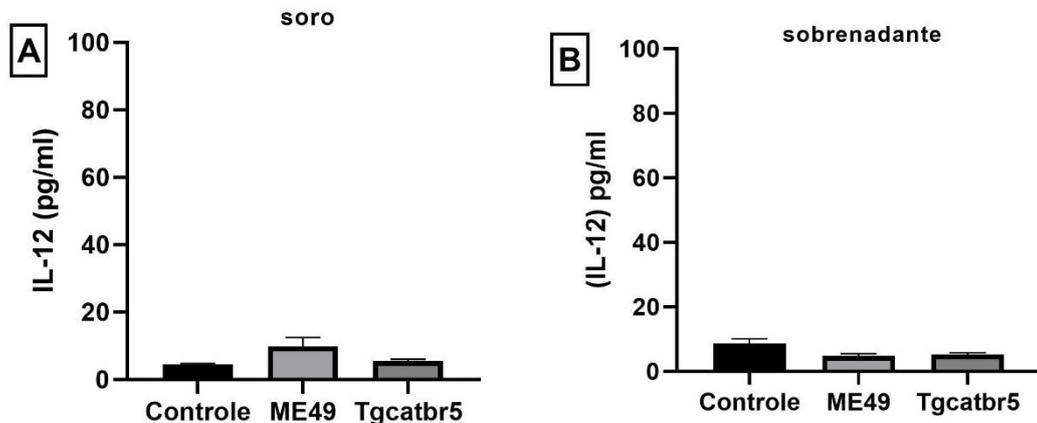


Figura 20. Concentrações em pg/ml de IL-12 p70 após 10 dias de infecção em camundongos controle não infectados, infectados por ME49 e infectados por Tgcatbr5. **(A)** Níveis de IL-12 p70 em amostras de soro. **(B)** Níveis de IL-12 p70 em amostras de sobrenadante encefálico. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$); $p > 0,05$ nas variantes analisadas.

Um fato curioso diz respeito à produção de MCP-1 entre os grupos experimentais, pois apesar do padrão de resposta pró-inflamatória estar presente em ambos os grupos infectados, apenas os animais infectados por Tgcatbr5 exibiram titulações significativas de MCP-1 tanto no soro, sendo estatisticamente

diferente do controle ($p=0,0279$) (Figura 21A), quanto no sobrenadante, sendo estatisticamente diferente do controle ($p=0,0159$) e do grupo infectado por ME49 ($p=0,0406$) (Figura 21B). Podendo este, ser um dos fatores associado a acentuada virulência de Tgcatbr5.

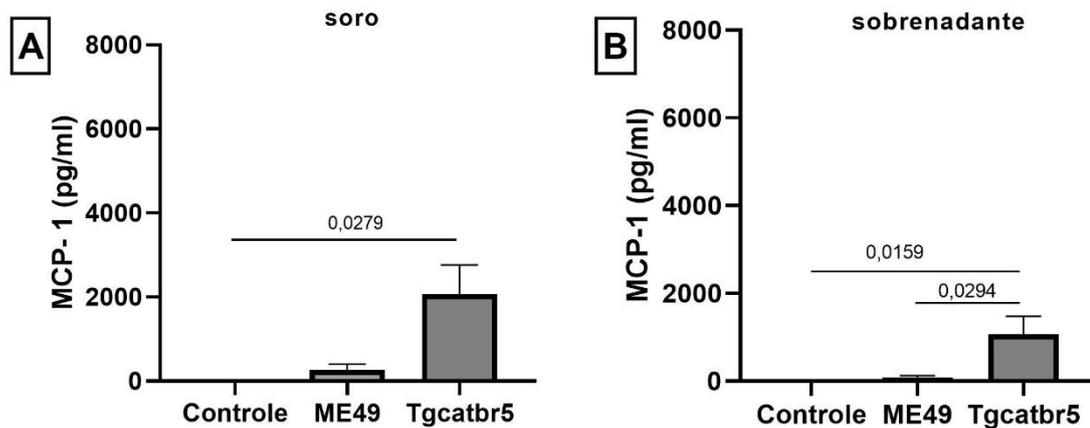


Figura 21. Concentrações em pg/ml de MCP-1 após 10 dias de infecção em camundongos controle não infectados, infectados por ME49 e infectados por Tgcatbr5. **(A)** Níveis de MCP-1 em amostras de soro. **(B)** Níveis de MCP-1 em amostras de sobrenadante encefálico. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$). As barras horizontais em A e B representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$) no teste *t* de Student.

De igual modo, as concentrações de IL-6 foram significativamente maiores nos soros e sobrenadantes de animais infectados por Tgcatbr5 quando comparado ao controle ($p=0,0496$ e $p=0,0047$), respectivamente, podendo ser observadas na figura 22A-B. Em relação às amostras analisadas, verifica-se maior diferença estatística na concentração de IL-6 no sobrenadante encefálico de Tgcatbr5 em relação ao controle.

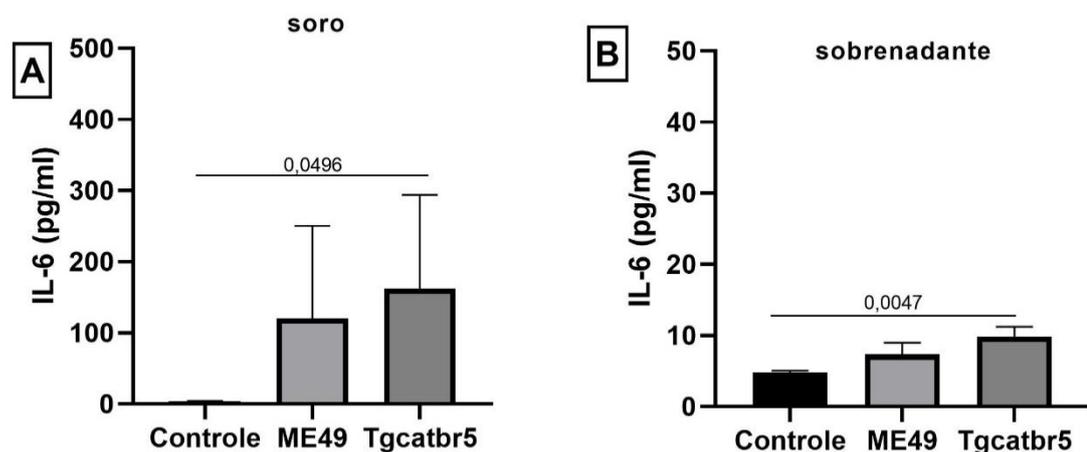


Figura 22. Concentrações em pg/ml de IL-6 após 10 dias de infecção em camundongos controle não infectados, infectados por ME49 e infectados por Tgcatbr5. **(A)** Níveis de IL-6 em amostras de soro. **(B)** Níveis de IL-6 em amostras de sobrenadante encefálico. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$). As barras horizontais em A e B representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$) no teste *t* de Student.

A citocina anti-inflamatória avaliada, IL-10, parece ter sido regulada negativamente no sobrenadante encefálico de ambos os grupos infectados, visto que foram encontradas maiores concentrações no grupo controle, sendo estatisticamente diferente do grupo infectado por ME49 ($p=0,0327$) e do grupo infectado por Tgcatbr5 ($p=0,0088$), conforme visto na figura 23B. Concomitantemente, em amostras séricas, não observamos diferenças significativas (figura 23A), mas encontramos produção evidente nos animais infectados por Tgcatbr5, considerando que com a síntese acentuada de citocinas pró-inflamatórias, respostas do tipo *Th2* ocorrem para criar um ambiente menos lesivo, ainda que não sejam capazes de contrabalancear de fato, em infecção por cepas virulentas.

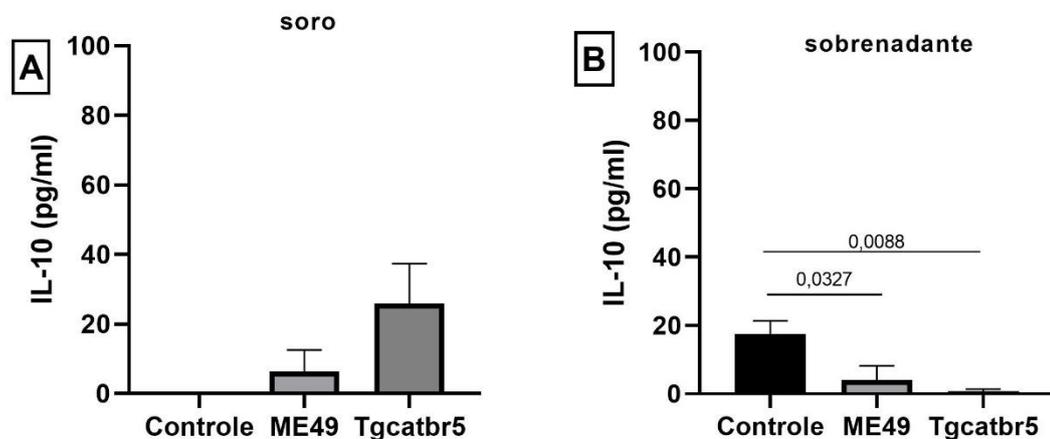


Figura 23. Concentrações em pg/ml de IL-10 após 10 dias de infecção em camundongos controle não infectados, infectados por ME49 e infectados por Tgcatbr5. **(A)** Níveis de IL-10 em amostras de soro. **(B)** Níveis de IL-10 em amostras de sobrenadante encefálico. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$). As barras horizontais em B representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$) no teste *t* de Student.

6.5 Análise de histologia encefálica

Seções cerebrais coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram avaliadas a fim de buscar possíveis processos inflamatórios. Regiões do córtex pré-frontal de

animais do grupo controle exibiram arquitetura normal (Figura 24A), enquanto naqueles infectados pela cepa Tgcatbr5 é possível observar maior densidade celular, presença de células inflamatórias mononucleares (ponta de seta preta) e agregado de células sugestivo de processo inflamatório (seta). Além disso, a meninge apresenta ruptura (ponta de seta laranja) e difusa celularidade (Figura 24B). O mesmo resultado não foi encontrado nos animais infectados com ME49, os quais também exibiram arquitetura normal. As falhas de tecido presentes nas imagens se caracterizam como artefato possivelmente ocorrido por danos mecânicos durante o corte (Figura 24C).

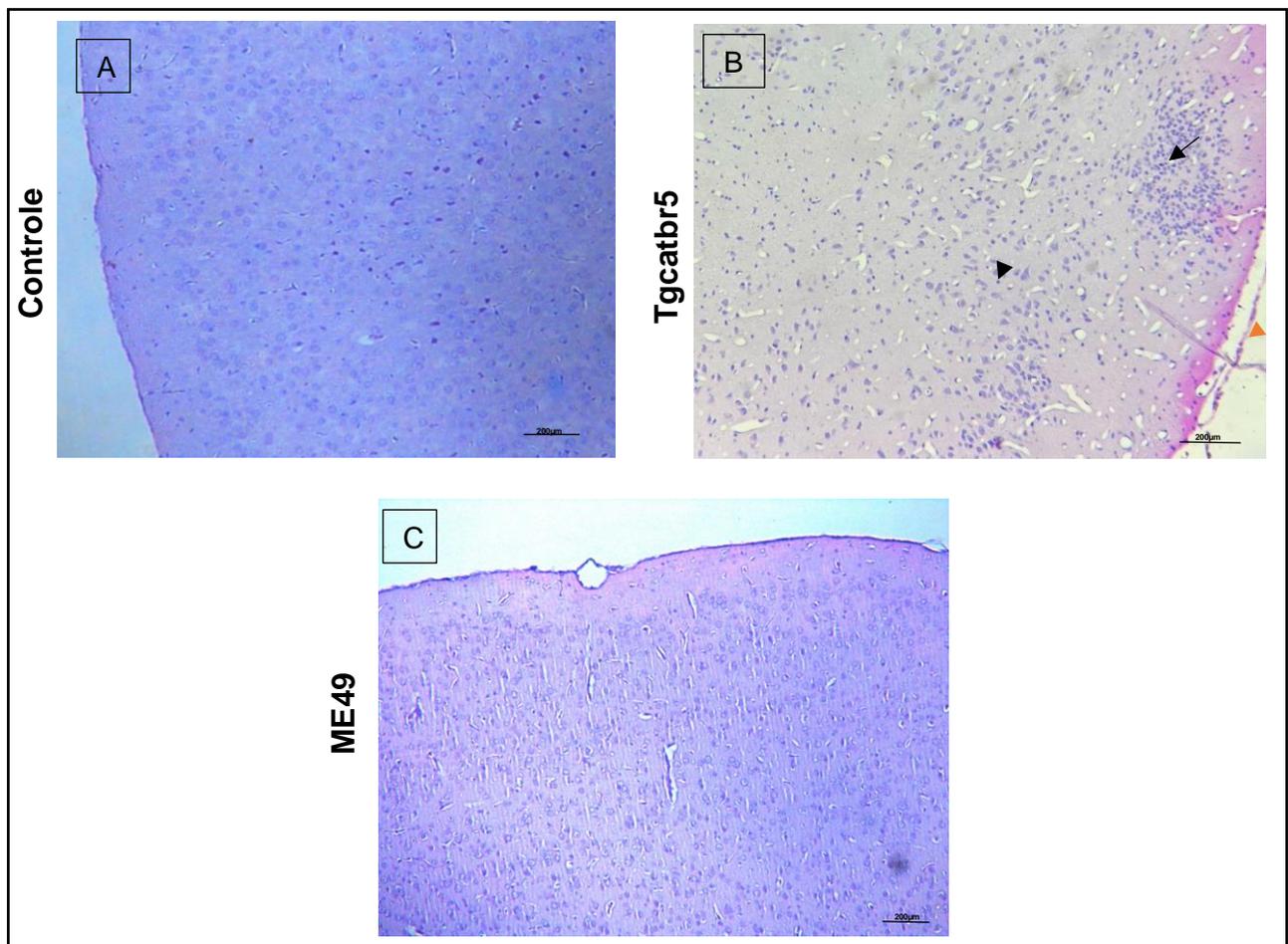


Figura 24. Cortes histológicas de córtex pré-frontal no aumento de 100x. **A)** Camundongos controle não infectados apresentando normalidade **B)** Camundongos infectados com Tgcatbr5 com a presença de densidade celular elevada e infiltrado inflamatório (seta), além de ruptura da integridade da meninge (ponta de seta laranja) **C)** Camundongos infectados com ME49 apresentando tecido nervoso e meninge preservada.

A figura 25 (A-C) traz imagens referentes ao complexo amigdalóide. Não foram encontradas características que indiquem algum processo inflamatório ou degenerativo. A integridade geral do tecido parece preservada e a densidade celular aumentada em algumas áreas parece estar dentro dos padrões de normalidade, considerando que se trata de uma região composta por áreas nucleares. Os espaços vistos em “claro” são vasos sanguíneos e não referenciam alteração. O hipocampo também foi analisado e apresentou histologia normal em nos três grupos experimentais, as camadas celulares parecem organizadas, com núcleos visíveis e arranjados (Figura 26A-C).

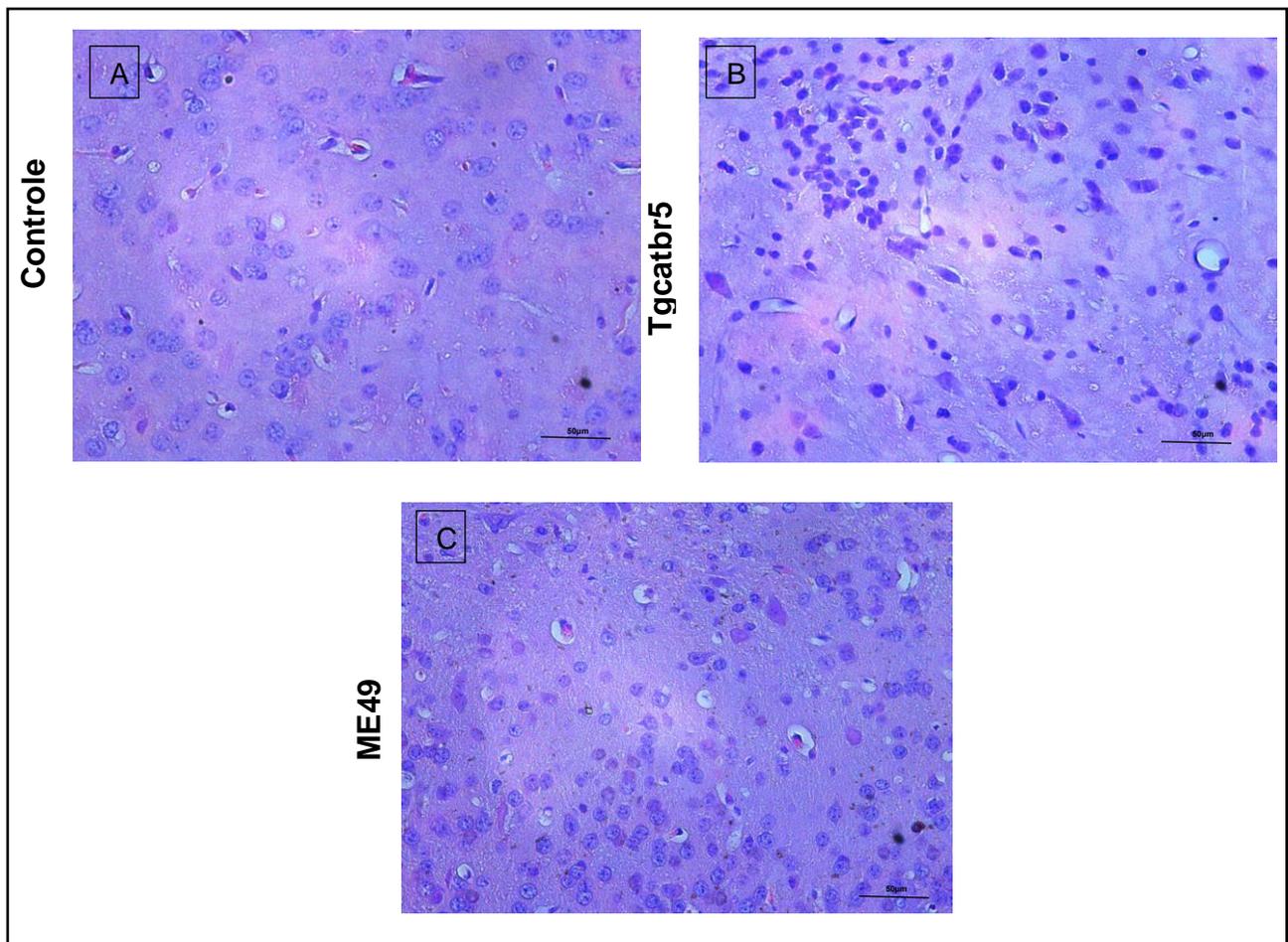


Figura 25. Histologia do complexo amigdalóide no aumento de 400x. **A)** Camundongos controle não infectados. **B)** Camundongos infectados com Tgcatbr5. **C)** Camundongos infectados com ME49. Os três grupos experimentais apresentam características normais

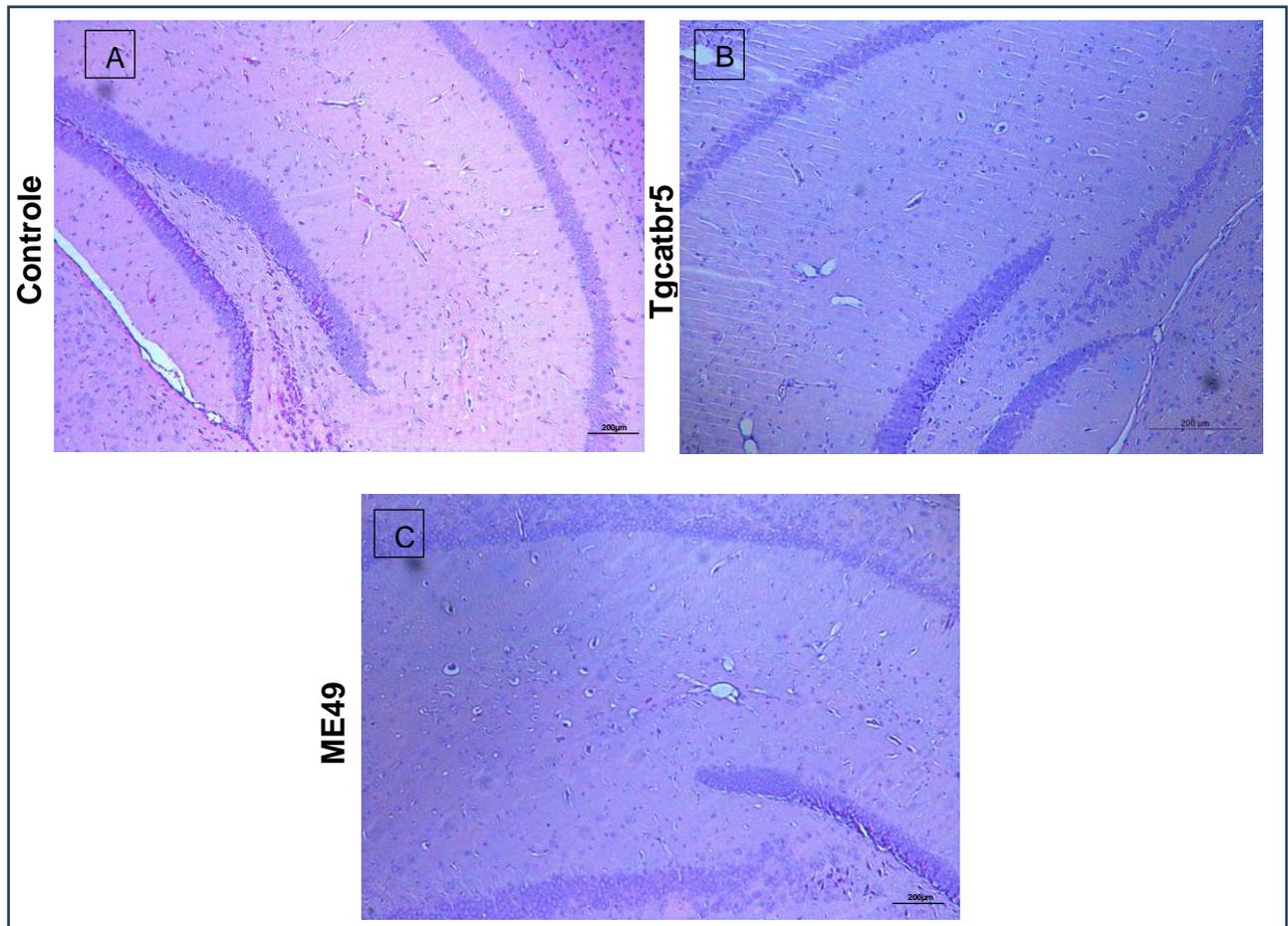


Figura 26. Histologia do hipocampo no aumento de 100x. **A)** Camundongos controle não infectados. **B)** Camundongos infectados com Tgcatbr5 **C)** Camundongos infectados com ME49. Os três grupos experimentais apresentam características normais.

6.6 Testes Comportamentais

6.6.1 Teste de reconhecimento de objetos (TRO)

Os resultados acerca da análise de memória a longo prazo durante a infecção podem ser encontrados na figura 27. Podemos observar em (A) que o grupo controle passou maior tempo explorando o objeto considerado novo em relação a infecção pela cepa ME49 ($p= 0,0151$) e também a Tgcatbr5, mas sem diferença estatística. Em relação ao tempo de exploração no objeto já conhecido pelo animal, tanto a infecção por ME49 quanto por Tgcatbr5 levaram os animais a explorar o objeto já conhecido e o objeto novo em intervalos similares de tempo, ainda que não tenham sido encontrada significância na análise *post hoc* (Figura 27B). Desta forma, esses dados indicam que os animais não identificaram

diferenças entre os objetos, possivelmente por comprometimento da memória e do aprendizado.

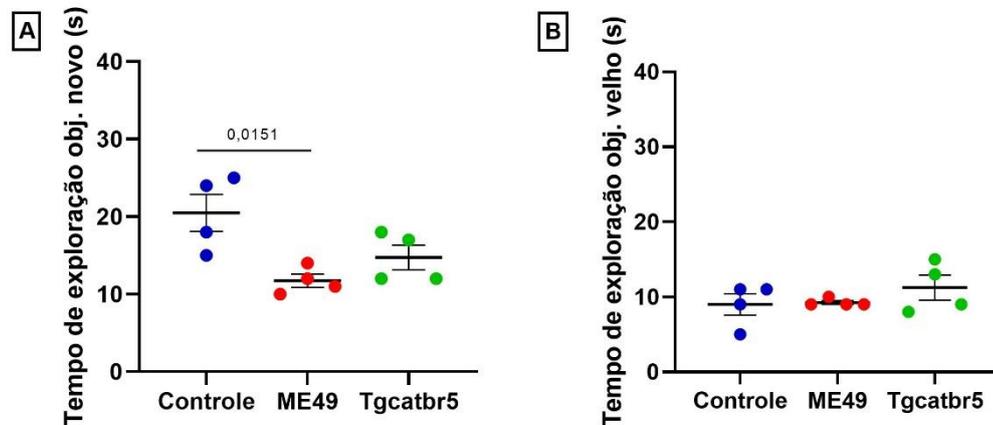


Figura 27. Desempenho cognitivo no teste de reconhecimento de objetos em animais controle não infectados e animais infectados pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5. **(A)** Quantificação do tempo de exploração no objeto novo em segundos apresentado 24h após teste com 2 objetos idênticos. **(B)** Quantificação do tempo de exploração no objeto já apresentado 24h antes em segundos. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$). A barra horizontal em A representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$) no teste de *Tukey-Kramer*.

6.6.2 Teste de suspensão pela cauda

O tempo de mobilidade e imobilidade no teste de SC é avaliado a partir dos últimos 4 minutos e traz dados que podem associar ou não os grupos experimentais a comportamentos depressivos. Desta forma, na figura 28 é possível observar os efeitos da infecção pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5, assim como controle não infectados no tempo de mobilidade e imobilidade dos animais quando suspensos. Em (A) os resultados mostraram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0,05$) quanto ao tempo de mobilidade. Dados semelhantes são encontrados quando observamos o tempo de imobilidade (figura 28B), onde novamente não se observam diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$). Com isso, detectamos que com 8 dias de infecção ainda não foram possíveis encontrar comportamentos semelhantes a depressão.

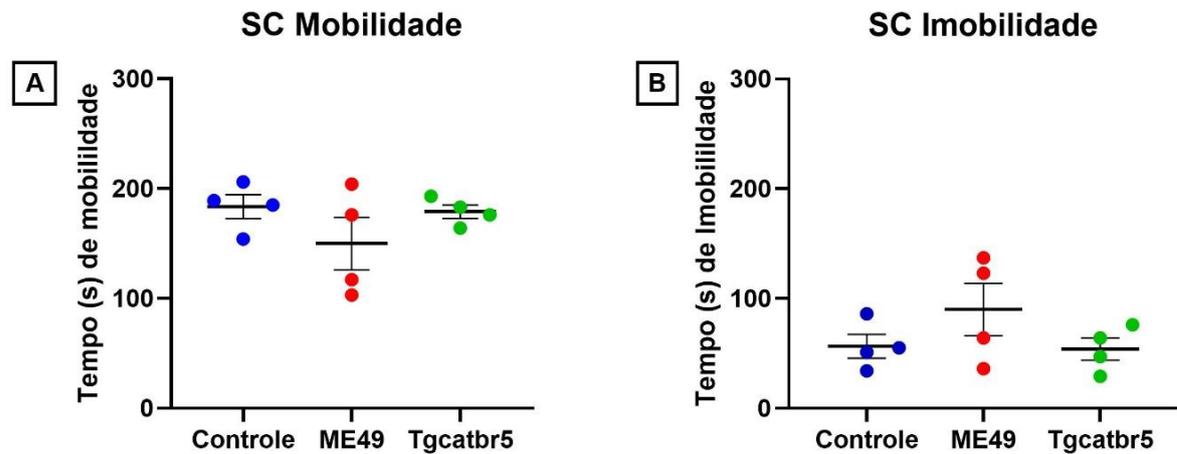


Figura 28. Teste de suspensão pela cauda em animais controle não infectados e animais infectados pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5. **(A)** Quantificação do tempo mobilidade em segundos nos últimos 4 minutos do ensaio. **(B)** Quantificação do tempo total de imobilidade em segundos nos últimos 4 minutos do ensaio. Os dados foram representados como média e erro padrão da média ($M \pm SEM$); $p > 0,05$ nas variantes analisadas.

6.6.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O teste do LCE é amplamente utilizado para avaliar comportamentos semelhantes a ansiedade, pois se baseia na aversão natural do animal a lugares abertos e elevados com o conflito interno instintivo de explorar novos ambientes (KOMADA *et al.*, 2008). Em nosso trabalho foi possível observar que os animais infectados pela cepa Tgcatbr5 apresentaram maior número de entrada nos braços abertos do labirinto ($p=0,0106$) (Figura 29A), além de maior tempo gasto nos braços abertos ($p=0,0377$) (Figura 29B) em relação ao grupo controle. Também é possível sugerir um comportamento semelhante induzido na infecção pela cepa ME49, conforme evidenciado de forma gráfica, ainda que a dispersão não tenha possibilitado a significância estatística. Este dado é indicativo de que a infecção por *T. gondii* causa diminuição de respostas associadas a medo e ansiedade. Quanto ao número de entradas nos braços fechados e tempo de permanência nos mesmos (Figura 29C-D), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$). Ainda que não tenha sido observada significância, se identifica na figura 29C que os animais infectados por ambas as cepas apresentaram maior número de entradas no braço fechado, o que indica maior atividade locomotora e corrobora com perspectiva de redução da ansiedade.

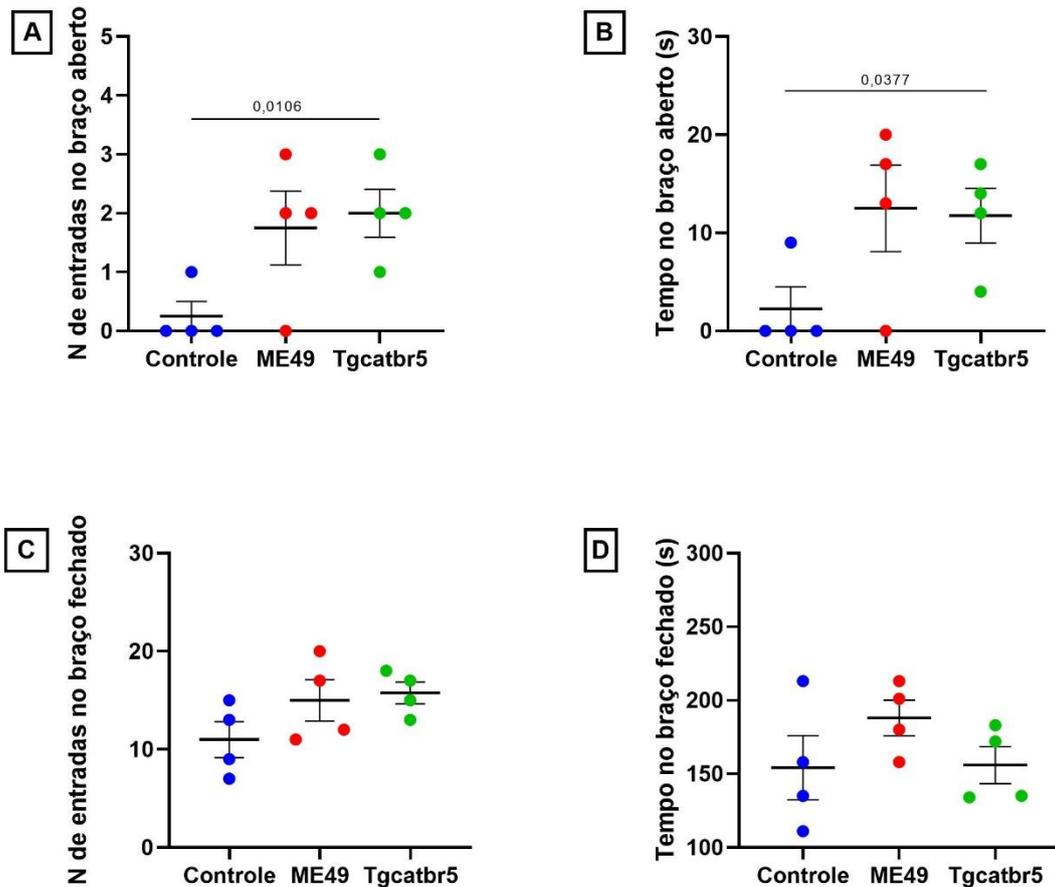


Figura 29. Teste do labirinto em cruz elevado em animais controle não infectados e animais infectados pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5. Quantificação do número de entradas nos braços abertos **(A)** e fechados **(C)** Quantificação do tempo, em segundos, gasto nos braços abertos **(B)** e fechados **(D)**. Os dados foram representados como média e o erro padrão da média ($M \pm SEM$). A barra horizontal em A e B representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$) no teste *t de Student*.

Além dos parâmetros convencionas, foram avaliados comportamentos associados à avaliação de risco, como o número de espreitas e de *headdippings*, e o referencial para análise emocional, que é a contagem de bolos fecais expelidos durante o teste. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação número de espreitas (Figura 30A). No entanto, relativo ao número de *headdippings*, os animais infectados pela cepa ME49 diferiram do grupo controle na estatística ($p=0,0268$), apresentando maior número de movimentos exploratórios que ultrapassam a cabeça do assoalho do braço aberto (Figura 30B). Também é possível observar comportamento semelhante na infecção

pela cepa Tgcatbr5 conforme evidenciado na ilustração dos dados, entretanto, a dispersão não possibilitou diferença estatística significativa (Figura 30B). Esses comportamentos reforçam o pressuposto do aumento de respostas exploratórias mediadas pela infecção por *T. gondii*. Na figura 30C verificamos o número de bolos fecais expelidos pelos grupos, podendo inferir que não houve respostas fisiológicas significativas associadas à medo.

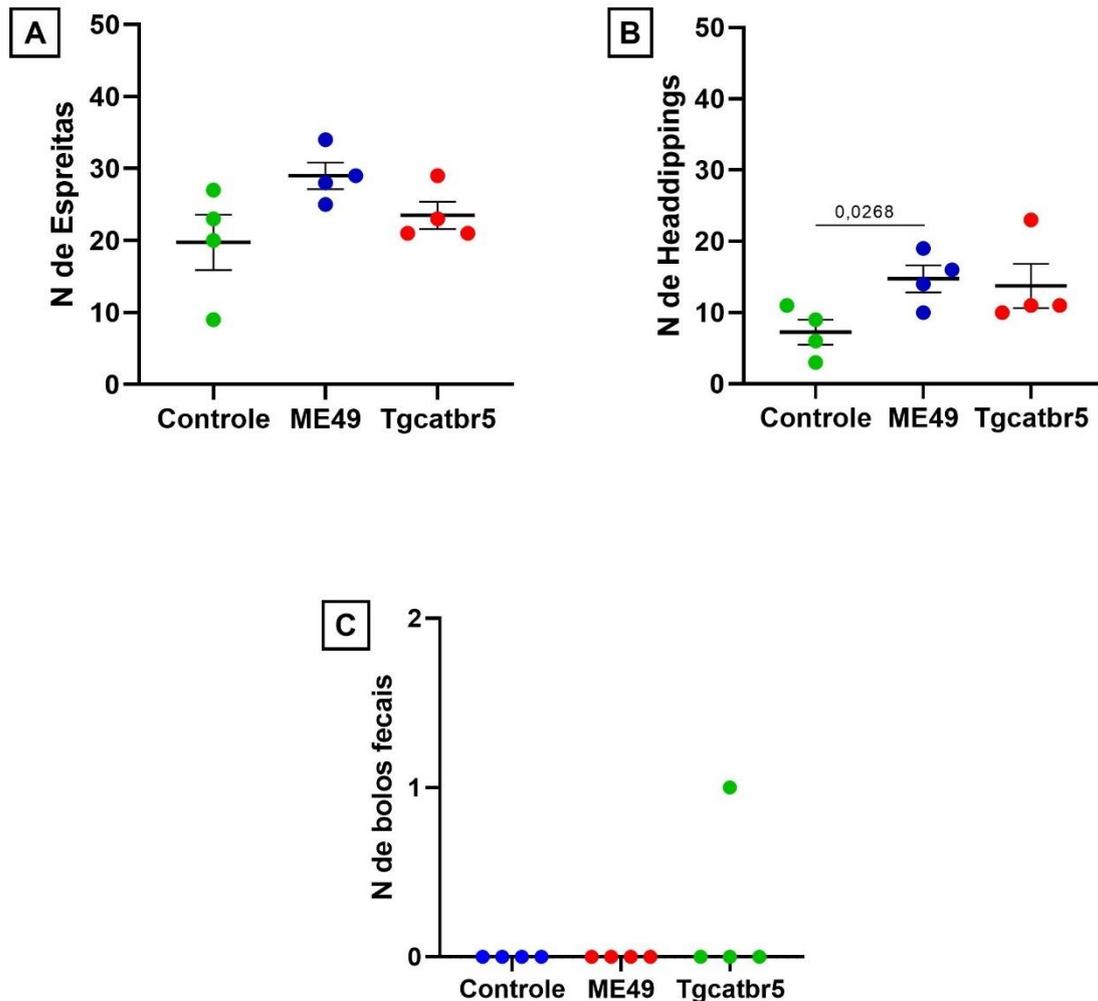


Figura 30. Parâmetros de avaliação de risco do teste do labirinto em cruz elevado em animais controle não infectados e animais infectados pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5. **(A)** Número de vezes que o animal se estendeu com as patas dianteiras sem retirar suas patas traseiras do lugar, voltando em seguida à posição original. **(B)** Número de vezes em que o animal ultrapassa a cabeça do tablado do braço aberto. **(C)** Número de bolos fecais expelidos durante o teste. Os dados foram representados como média e o erro padrão da média ($M \pm SEM$). A barra horizontal em B representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$) no teste *t de Student*.

6.6.4 Teste do Labirinto em Y

O teste do labirinto em Y foi utilizado para avaliar a aversão do animal ao odor do predador. Na figura 31 é possível analisar os resultados desta análise. Encontramos resultados referentes ao odor felino e se observa que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no número de entradas (Figura 31A) e tempo gasto no braço com odor felino (Figura 31B) nos animais infectados por ME49 e Tgcatbr5 em relação ao grupo controle. Já em relação ao odor neutro, quanto ao número de entradas no braço com o odor neutro (Figura 31C) não houve diferenças estatísticas significantes. No entanto, quando analisado o tempo gasto neste braço, sem o odor felino, (Figura 31D) observamos que os animais infectados tanto por ME49 quanto por Tgcatbr5 apresentaram maior tempo em relação ao grupo controle, sendo $p=0,0396$ e $p=0,0272$, respectivamente. Na figura 31E se detecta o número de bolos fecais excretados durante o teste e não houve distinção estatisticamente significativa entre os grupos. Esses dados sugerem que os animais infectados não perderam a aversão inata ao odor do predador até o 9º dia pi e apresentaram preferência ao odor neutro.

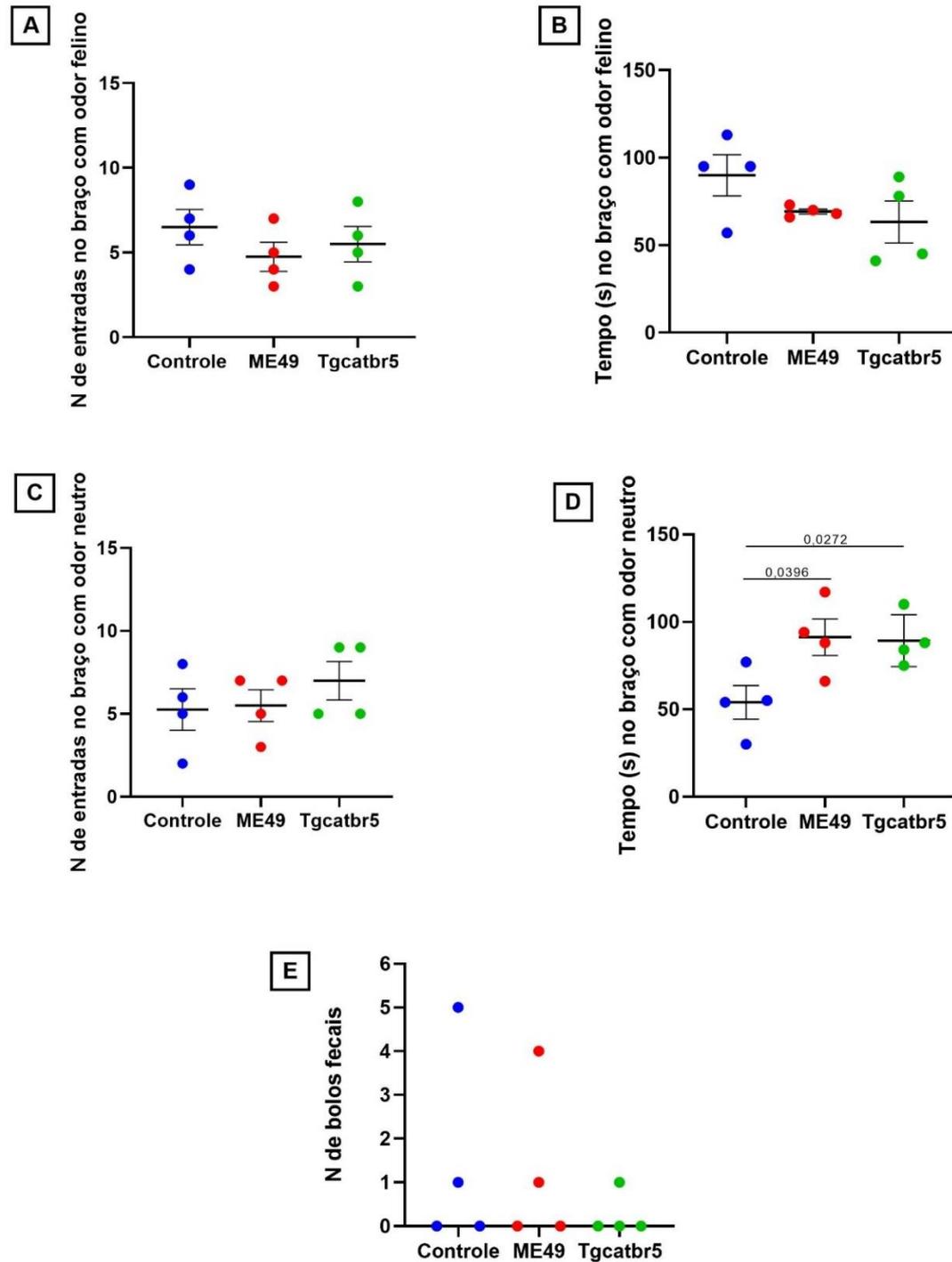


Figura 31. Teste do labirinto em Y em animais controle não infectados e animais infectados pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5. **(A)** Quantificação do número de entradas no braço contendo o odor felino. **(B)** Quantificação do tempo em segundos passado no braço com odor felino. **(C)** Quantificação do número de entradas no braço contendo o odor neutro. **(D)** Quantificação do tempo em segundos passado no braço com odor neutro. **(E)** Número de bolos fecais excretados. Os dados foram representados como média e o erro padrão da média ($M \pm SEM$). As barras horizontais em D representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$) teste *t de Student*.

6.6.5 Teste do Campo aberto

Os animais que realizaram o LCE foram submetidos 24h após ao teste de Campo Aberto, desta forma, os testes podem ser interpretados de forma conjunta. Na figura 32A se pode verificar a distância total percorrida pelos animais na arena em 10 minutos, os quais foram divididos em 4 quadrantes de 2 minutos e 30 segundos. A análise *post-hoc* do teste *t* de *Student* revelou que os animais infectados pela cepa Tgcatbr5 percorreram maior distância em comparação com o grupo ME49 ($p=0,0368$) e, como esperado, no intervalo inicial os animais alcançam maior locomoção devido ao instinto de exploração. Em (B) observa-se a distância percorrida na zona central, onde não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0,05$) e em (C) o número de bolos fecais expelidos, admitido como parâmetro emocional, o qual foi visualmente maior nos animais infectados pela cepa Tgcatbr5, ainda que não sejam encontradas diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$). Desta forma, se nota que a infecção por Tgcatbr5 aumentou a atividade exploratória dos animais, ainda que respostas fisiológicas associadas a medo estejam associadas.

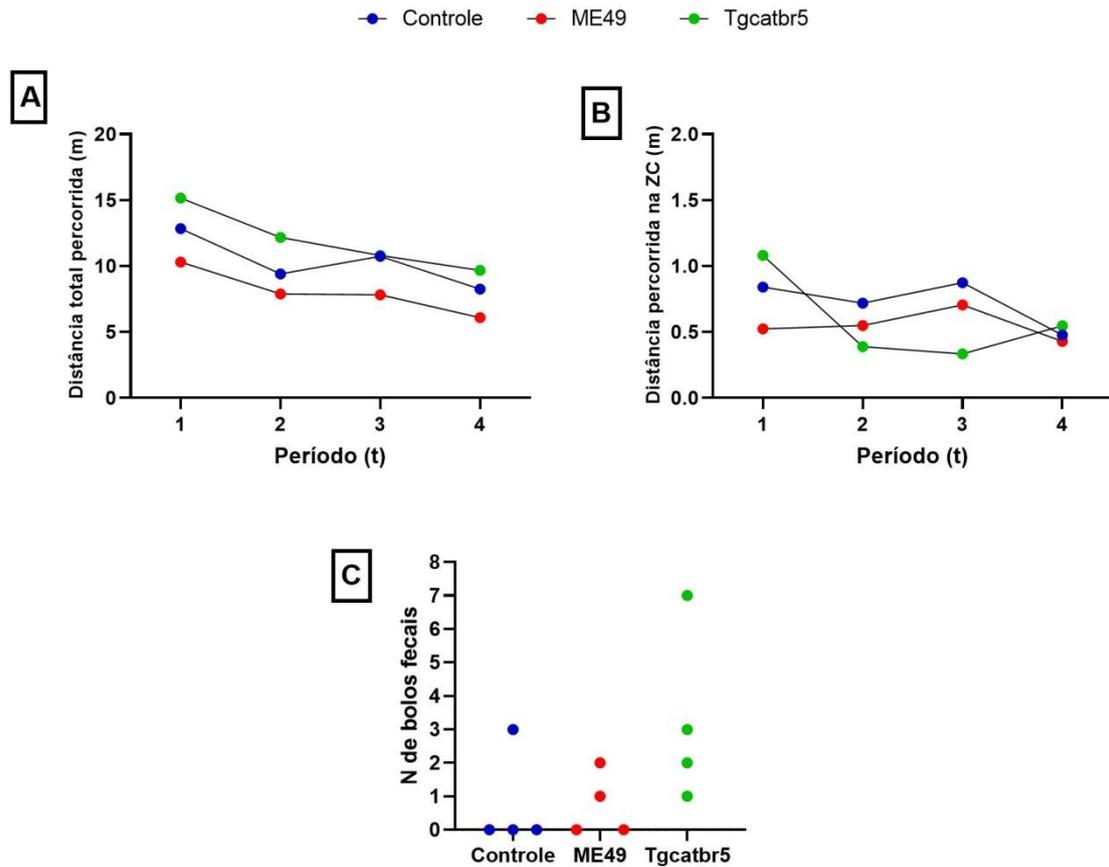


Figura 32. Teste do campo aberto em animais controle não infectados e animais infectados pela cepa ME49 e cepa Tgcatbr5. **(A)** Distância total em metros durante os 4 quadrantes de intervalo de tempo (referente à sequência de 2 minutos e 30 segundos) percorrida pelos animais. **(B)** Distância em metros durante os 4 quadrantes de intervalo de tempo (referente à sequência de 2 minutos e 30 segundos) percorrida pelos animais na zona central (ZC). **(C)** Números de bolos fecais expelidos na arena durante o teste.

7. DISCUSSÃO

A diversidade de cepas de *Toxoplasma gondii* e a resposta imune desencadeada pela infecção torna a interação parasito e hospedeiro algo complexo. O uso de cepas virulentas para o estudo de *T. gondii* é limitado devido a rápida letalidade. Desta forma, o presente trabalho se baseou em relacionar dados comportamentais a padrões de resposta imunológica utilizando a cepa Tgcatbr5 de *T. gondii*, virulenta, comparando com a infecção por ME49, cepa clonal bem estabelecida na literatura, e controles não infectados.

Este é primeiro estudo que traz detalhes e caracteriza a virulência de Tgcatbr5 no modelo murino. Os testes de virulências utilizando Tgcatbr5 foram realizados em busca de determinar a quantidade ideal de inóculo para experimentação e de entender como se dá a sobrevivência dos animais mediante a infecção, para posterior organização do experimento, uma vez que a virulência é comumente determinada pela taxa de mortalidade de camundongos infectados (HILL *et al* 2012). Os dados descritos acerca de Tgcatbr5 na literatura se limitam ao seu artigo de descoberta, onde Dubey e colaboradores (2004) descrevem que a inoculação dos isolados descobertos levavam a morte dos animais em até 28 pi, de forma geral e não especificando Tgcatbr5.

Em nossos estudos de virulência, pôde-se observar que a infecção com o inóculo a partir do tubo com descongelamento direto (Protocolo 1) não ocorreu e que são necessárias passagens via meio de cultivo celular para que retorne ao parasito o potencial de infecção. A segunda passagem de taquizoitos em meio de cultivo (Protocolo 3) celular pareceu aumentar o potencial de infectividade da cepa, pois se observaram mortes precoces em relação à infecção com taquizoitos provenientes de apenas uma passagem (Protocolo 2). Sabe-se que algumas cepas pertencentes a linhagem do tipo I são letais independente da dose de inoculação, sendo um único parasito viável necessário para os óbitos em camundongos (SARAF, 2017). Dado este semelhante ao encontrado neste estudo de virulência, onde mais de 50% dos animais morreram de toxoplasmose aguda, mesmo com a administração de inóculos em concentrações menores, ainda que Tgcatbr5 tenha se assemelhado mais ao genótipo III quando descoberta (DUBEY *et al.*, 2004). Animais infectados com 1×10^4

taquizoitos da cepa RH morrem até 7 dias pi (NGUYEN *et al.*, 2003) e em nosso experimento com o protocolo 3, ao utilizar 1×10^4 taquizoitos de Tgcatbr5 como inóculo, observamos óbitos com 9 dias pi, indicando virulência reduzida em relação a RH. De fato, em nossos dados foram observados alguns sobreviventes com o protocolo 2 de experimentação, ainda que houvesse posterior reativação da doença e óbito.

Sete dias foi o tempo mínimo para manifestação dos sinais clínicos nas duas experimentações de virulência utilizando passagem de taquizoitos em meio celular previamente. Além disso, o inóculo de 1000 taquizoitos provenientes de uma passagem em meio de cultivo celular (Protocolo 2) se apresentou como quantidade ideal, pois os animais apresentaram sinais clínicos e vieram a óbito em períodos próximos, apresentando títulos de anticorpos semelhantes. Desta forma, conforme observado anteriormente, as análises do ensaio de infecção tiveram início do sétimo ao nono dia pi, devido a observação nos testes de virulência de óbitos naturais entre os dias 10 e 14 pi, de forma que os animais não realizassem os testes de comportamento debilitados pela infecção.

Foi observada variabilidade de óbitos e concentração de imunoglobulinas a partir de uma mesma quantidade de inóculo. Além disso, menores concentrações de taquizoitos não foram indicativas de óbitos tardios, indicando características individuais de resposta à infecção mesmo que a população usada seja isogênica. Ferreira e colaboradores (2001) observaram um dado semelhante, ao utilizar taquizoitos da linhagem P de *T. gondii*, isolados de cachorros no estado de São Paulo. Esses parasitos foram considerados avirulentos e semelhante a ME49, no entanto, observou a presença de óbitos naturais 19 pi. Não foi encontrada relação altamente específica entre quantidade de inóculo e dias para morte no teste de virulência utilizando o protocolo 2, enquanto que, quando utilizado duas passagens (protocolo 3) observamos uma homogeneidade da infecção. Em concordância com nossos dados, foi observado em outros estudos, aumento da viabilidade, colheita de taquizoitos de forma mais satisfatória e aumento da virulência em camundongos após passagens do parasito em cultura (EVAN *et al.*, 1999; SARAF *et al.*, 2017; BAHREINI *et al* 2021).

Quanto a análise de imunoglobulinas no teste de virulência do protocolo 2, observamos que 1 animal infectado com 2000 taquizoitos teve a sorologia inicial

negativa para IgM e IgG anti-*T. gondii* na coleta com 18 dias pi e altos títulos de IgG na coleta com 60 pi, após reativação da infecção, o que indica uma resposta imune desencadeada de forma “tardia”, ainda que na literatura seja relatada a detecção de anticorpos IgM com cerca de 7-10 dias e IgG com 10-14 dias pi (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004; CORREA *et al.*, 2007). Além disso, o animal apresentou cistos teciduais no SNC, assim como o sobrevivente infectado com 500 taquizoitos. O sobrevivente infectado com 1500 taquizoitos traz evidências de que a infecção não ocorreu no animal, ainda que o inoculo utilizado tenha sido o mesmo ao administrado no animal do mesmo grupo que veio a óbito. Além disso, os altos títulos de imunoglobulinas demonstram a incapacidade da imunidade humoral em prevenir a reativação de *T. gondii*, pois da mesma forma que os altos títulos de IgG encontrados no animal infectado com 2000 taquizoitos após 60 dias de infecção não impossibilitou o seu óbito, há relatos de reativações da toxoplasmose em pacientes HIV positivos infectados, mesmo que os anticorpos estejam presentes (SANA *et al.*, 2022).

Apesar das informações disponíveis na literatura serem limitadas, nós demonstramos através dos dados obtidos que a infecção por Tgcatbr5 é complexa. A linhagem se mostrou virulenta, com altas taxas de mortalidade, mas também foi capaz de se manter de forma crônica em alguns indivíduos sem a influência de agentes externos, como medicações. Dessa forma, apresenta características aparentemente conflitantes, sendo simultaneamente virulenta e cystogênica.

Os resultados pertinentes ao experimento central trazem heterogeneidade na dosagem de imunoglobulinas, uma vez que nem todos os animais apresentaram sorologia positiva para IgM anti-*T. gondii*. Este dado é sugestivo de resultados falso-negativos devido a infecção recente (10 dias) e o tempo de resposta imunológica individual, corroborando com os testes de virulência, conforme descrito anteriormente, onde um dos animais infectado com 2000 taquizoits do protocolo 2 do teste de virulência obteve sorologia negativa até mesmo com 18 dias pi, permaneceu vivo e tinha elevadas concentrações de IgG na coleta com 60 dias pi. Sabe-se que produção de IgM pode ser detectada com cerca de 1 semana de infecção, entretanto, seu pico de produção é com aproximadamente 1 mês pi (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004; DE SOUZA & BELFORT, 2014).

Ainda no contexto dos mediadores envolvidos na resposta imunológica, em nosso trabalho realizamos a dosagem de óxido nítrico de forma indireta, pela detecção de nitrito em amostras séricas e sobrenadantes de macerado encefálico. No entanto, não foi constatado níveis detectáveis de NO nas amostras testadas, tanto no grupo controle, quanto nos grupos infectados. Em concentrações fisiológicas, o óxido nítrico exerce uma função neuroprotetora no SNC, assim como em outros tecidos do organismo. Na infecção por *T. gondii*, as células microgлияis e macrófagos infiltrados sintetizam NO para inibir a replicação de *T. gondii*, sendo um dos mecanismos exercidos por ele a nitratação de vacúolos parasitóforos. Entretanto, se produzido em excesso, o NO pode se tornar neurotóxico, contribuindo para a degeneração dos neurônios (DINCEL & ATMACA, 2015; ZHAO *et al.*, 2024). Damasceno-Sá e colaboradores (2021) avaliaram a produção de NO por macrófagos após a infecção por diferentes cepas e concluíram que *T. gondii* tem a capacidade de inibir o sistema de defesa microbicida do NO. Além disso, foi demonstrado que fatores solúveis liberados por astrócitos infectados por *T. gondii* podem modular negativamente a produção de óxido nítrico pela micróglia ativada em resposta a IFN- γ (ROZENFELD *et al.*, 2003). Estes podem ser alguns dos fatores associados aos resultados negativos encontrados nas amostras de animais infectados. No entanto, a ausência de NO em todos os três grupos experimentais pode dizer a respeito uma baixa sensibilidade do teste em detectar pequenas concentrações de NO.

Os ensaios comportamentais revelaram um possível comprometimento do aprendizado e memória de longo prazo nos animais infectados por ambas as cepas no TRO, visto que o tempo de exploração no objeto já conhecido e no objeto novo foi similar, enquanto o grupo controle explorou de forma estatisticamente significativa mais o objeto novo. Testes que avaliam a função cognitiva são comuns na avaliação da infecção por *T. gondii*, já que diversos estudos associam a presença do parasito com distúrbios neurológicos (TORRES *et al.*, 2018; VIRUS *et al.*, 2021; NAYERI; *et al* 2021). O prejuízo da memória de curto e longo prazo em animais infectados por ME49 também foi encontrado por Evangelista *et al.*, 2021. Este comprometimento fornece evidências de que a infecção por *T. gondii* afeta o SNC.

Ao analisar o aspecto locomotor, observamos que no teste de CA os animais infectados pela cepa Tgcatbr5 apresentaram alterações significativas, com maior

atividade locomotora quando comparado a infecção por ME49 (Figura 32A). Dado este que corrobora com os testes de LCE, onde os animais infectados por Tgcatbr5 entraram significativamente mais vezes (Figura 29A) e passaram maior tempo nos braços abertos do aparato (Figura 29B) quando comparado ao controle. Ainda que não tenha sido observada a mesma significância no grupo infectado por ME49 no número de entradas e tempo nos braços abertos, o mesmo apresentou número significativo de *Headdippings* (Figura30B), que é um parâmetro de avaliação de risco e sugere atividade exploratória. Este aumento da função motora pode ser prejudicial ao animal já que o mesmo se torna mais suscetível à captura e predação, sugerindo que *T. gondii* pode manipular o comportamento do indivíduo de forma que se facilite a perpetuação do parasito para mais hospedeiros. Há diversos relatos anteriores da associação entre camundongos adultos infectados com *T. gondii* e a diminuição de respostas associadas a ansiedade e aumento da exploração (EELSS *et al.*, 2015; BOILLAT *et al.*, 2020; LAING *et al* 2020). Um estudo acerca do LCE comparou diferentes linhagens de camundongos sadios e concluiu que naturalmente camundongos C57BL/6 tendem a evitar os braços abertos (KOMADA *et al.*, 2008), o que sugere que os comportamentos observados no experimento são de fato causados pela infecção por *T. gondii*.

A atividade representada no CA está intimamente ligada à sinalização dopaminérgica, visto que a dopamina demonstra impulsionar o comportamento exploratório em novos ambientes (COSTA *et al.*, 2014; LI *et al* 2018). Concentrações elevadas de dopamina se correlacionam à ocorrência de comportamentos impulsivos em humanos (FLEGR *et al.*, 2013; TONG *et al.*, 2021). Curiosamente um dos distúrbios neurológicos associados a maior síntese e liberação de dopamina é a esquizofrenia (HOWES *et al.*, 2024). Portanto, a atividade observada nos animais infectados por Tgcatbr5 traz evidências de que a toxoplasmose pode ser um fator associado ao desenvolvimento de esquizofrenia.

Em nosso trabalho não foram encontrados resultados que sugerem atração ao odor de felinos (Figura 31A-B). Ademais, foi encontrada preferência significativa pelo compartimento do odor neutro em ambos os grupos de animais infectados em relação ao controle (Figura 31D). Um estudo comparativo sobre a preferência de ratos infectados com a cepa PRU (tipo II) de *T. gondii* a adores de gatos domésticos ou felinos selvagens demonstrou que os animais exibiram uma “preferência”

significativa ao odor selvagem de seu predador natural (KAUSHIK *et al.*, 2014). Embora todos felídeos infectados sejam passíveis de excretar oocistos em suas fezes, estar em um hospedeiro 'livre' pode maximizar a transmissão do parasito. No entanto, também já foi demonstrado que a infecção por *T. gondii* não altera seletivamente o medo a predadores felinos. Um estudo que avaliava a exposição de camundongos infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* a odor de lince, raposa e porquinho-da-índia mostrou que não houve nenhuma atração particular pelo odor de lince (BOILLAT *et al.*, 2020). Um outro trabalho a partir de camundongos infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* revelou aversão significativa à urina de lince, demonstrando que os animais passaram significativamente menos tempo no quadrante do aparato contendo urina de lince do que no quadrante correspondente sem urina (EELSS *et al.*, 2015). Ainda, Bezerra e colaboradores (2019) realizaram o teste LY em diferentes fases da infecção com as cepas ME49 (tipo II) e VEG (tipo III). Foi observado que com 6 semanas pi, os animais infectados com a cepa VEG apresentaram preferência ao braço contendo urina de gato em relação a ME49 e ao controle, enquanto com 16 semanas pi essa preferência ocorreu pelo grupo controle, em comparação aos grupos infectados. Desta forma, encontramos diversos relatos que entram em conflito, tornando a compreensão de novos resultados ainda mais difícil e desafiadora, trazendo questões a serem discutidas mais profundamente como a espécie hospedeira, a cepa infectante, tempo de infecção e as metodologias utilizadas.

No teste de SC (Figura 28) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, o que nos leva a percepção de que até o 8 dia pi *T. gondii* não influenciou o comportamento de forma que fossem observadas condutas do tipo depressivas. Brito e colaboradores (2023) realizaram o teste de nado forçado, também usado para avaliar padrões comportamentais depressivos, em camundongos infectados pela cepa ME49 e pela cepa não clonal TgCkBrRN2 (CK2) e observaram que apenas a CK2 induziu o desenvolvimento de comportamento do tipo depressivo. Já em outro trabalho também utilizando camundongos infectados pela cepa ME49 ao realizar o teste de SC foi encontrado maior tempo de imobilidade em relação ao controle (CASTAÑO BARRIOS *et al.*, 2021). Um fato importante a ser pontuado é o tempo de infecção, onde nos estudos citados são de 4 semanas, ou seja, uma fase crônica, enquanto nosso trabalho traz resultados de uma fase aguda, o que pode ser um fator determinante nas convergências de resultados quanto a

cepa ME49, visto que acerca da cepa Tgcatbr5 não há literatura a ser citada. Ao analisar uma cepa também virulenta, um estudo que avaliou o teste do nado forçado e suspensão pela cauda em camundongos infectados com a cepa RH (tipo I) 6 dias pi observou maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle não infectado. No entanto, o tratamento com Sulfadiazina e Sulfadiazina associado a Arctigenina reduziu significativamente a duração da imobilidade dos camundongos infectados (CHENG *et al.*, 2020).

Quando avaliamos a histologia encefálica encontramos possíveis focos inflamatórios em regiões corticais de animais infectados por Tgcatbr5, mas não no grupo controle e grupo infectado por ME49 (Figura 24). Regiões do complexo amigdalóide e hipocampo (Figuras 25 e 26) também foram analisadas, entretanto, não houve a presença de elementos que indiquem algum processo inflamatório. Córtex, amígdala e hipocampo são regiões comumente avaliadas quando se trata da infecção por *T. gondii*, visto que as alterações comportamentais frequentemente encontradas são condutas depressivas, prejuízo de memória e variações na locomoção (ABDULAI-SAIKU *et al.*, 2017; BOILLAT *et al.*, 2020; TONG *et al.*, 2021). O córtex pré-frontal desempenha um papel crucial em diversas funções cognitivas, emocionais e comportamentais. Envolvido na tomada de decisões, modulação de comportamentos impulsivos e controle de emoções em resposta a estímulos, alguns transtornos psiquiátricos e condições neurológicas, como transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, transtorno obsessivo-compulsivo e esquizofrenia estão associados a disfunções nesta área (McTEAGUE *et al.*, 2016; FRIEDMAN & ROBBINS, 2022).

Foi observado que no SNC *T. gondii* se associa a células neuronais e pode contribuir para a perda neuronal, além disso, a maior quantidade de cistos foi encontrada no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal. Neste mesmo trabalho os animais apresentaram prejuízo de memória espacial, induzindo sinais de doença de Alzheimer (TORRES *et al.*, 2018). O córtex também foi o local encontrado com maior inflamação e a carga parasitária, seguida do hipocampo em camundongos Swiss Webster infectados com ME49 (HERMES *et al.*, 2008). Em um outro trabalho, meningoencefalite e manguitos perivasculares foram encontrados no córtex animais infectados por ME49 (EVANGELISTA *et al.*, 2021). CASTAÑO BARRIOS e colaboradores (2021) ao avaliarem animais infectados com ME49 encontraram

maior número de cistos teciduais nas regiões corticais e associação da infecção com neuroinflamação, pois foram encontrados focos inflamatórios em todas as áreas avaliadas do SNC e aumento de níveis séricos de MCP-1 e IFN- γ . Além disso os animais apresentavam hiperatividade nos testes comportamentais. Dados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho com a infecção por Tgcatbr5. Entretanto, majoritariamente, os estudos se limitam a análise por fase crônica da doença, enquanto nosso trabalho reflete a fase aguda de infecção, isto pode inferir sobre diferenças na infecção entre as cepas Tgcatbr5 e ME49 no presente trabalho, visto que cepas virulentas parecem levar a respostas mais robustas e, assim, alterações perceptíveis de forma primária.

O infiltrado inflamatório identificado no córtex pré-frontal dos animais infectados por Tgcatbr5 pode estar relacionado a etiologia do comportamento de hiperlocomoção (Figura 32) e à propensão a explorar espaços abertos (Figura 29), conforme demonstrado neste estudo. Por outro lado, embora os animais infectados pela cepa ME49 não tenham exibido sinais histológicos evidentes de inflamação no tecido nervoso, os déficits de memória e a tendência a exploração observadas nos testes comportamentais podem refletir o início de um processo inflamatório ainda não detectável histologicamente. Esse processo, no entanto, é sugerido pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF, em amostras séricas (Figura 18A e 19A). Essa resposta imune relativamente branda pode ser atribuída à virulência intermediária da cepa ME49.

Ao avaliar o tempo de detecção de *T. gondii* no SNC e a associação com a presença de células inflamatórias, foi demonstrado que níveis baixos, mas detectáveis, de *T. gondii* foram encontrados após 10 dias de infecção, sendo o pico de detecção com 15 dias pi. Sendo ainda, detectável dentro do mesmo intervalo de tempo em que monócitos foram recrutados (SCHNEIDER *et al.*, 2019). Desta forma, a presença de focos inflamatórios apenas no córtex pré-frontal e apenas na infecção pela cepa Tgcatbr5 parecem ser reflexo dos poucos dias de infecção e do potencial de virulência da cepa. Ademais, não está completamente claro se *T. gondii* possui preferência por se localizar em regiões específicas do SNC, ainda que alguns, mas não todos, estudos, relatem maior número de cistos em áreas corticais e amígdala (McCONKEY *et al.*, 2013).

Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória foram dosadas a fim de avaliar a resposta imunológica desencadeada pela cepa Tgcatbr5 e se há associação entre níveis de citocinas, tanto sistêmicas, quanto locais, e alterações no comportamento. Sabe-se que, tradicionalmente a resposta imunológica mediante a infecção por *T. gondii* inicia-se pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-12 e IFN- γ por células apresentadoras de antígeno (HOU *et al* 2011 FISCH *et al.*, 2019). Linfócitos e células mieloides expostas aos antígenos seguem para regulação positiva da produção de mais citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e também de quimiocinas, além da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β para evitar patologias no tecido (SANA *et al.*, 2022). A ação das células T contra o parasito é mediada principalmente por IFN- γ (SUZUKI *et al.*, 2011). A formação de infiltrados inflamatórios no SNC é um processo complexo e notavelmente regulado por quimiocinas. Astrócitos, células da glia e leucócitos inflamatórios produzem estes fatores, levando ao recrutamento e adesão de células imunológicas para o parênquima cerebral, as quais serão a principal fonte de IFN- γ (STRACK *et al.*, 2002).

Nossos dados demonstram relação entre altos níveis de IFN- γ no soro e sobrenadante encefálico de animais infectados com Tgcatbr5 e a presença de células mononucleares inflamatórias no córtex dos mesmos animais. Ainda que contribua para defesa, o excesso de IFN- γ pode induzir a neuroinflamação, portanto, seu aumento parece estar relacionado a inflamação tecidual observada, e, conseqüentemente, as alterações no comportamento. A ação de IFN- γ envolve a estimulação de uma série de eventos antimicrobianos dentro da célula hospedeira, como o impulso para limitação de triptofano e ativação de células imunes (HUNTER *et al.* 2012)

Como já relatado anteriormente, em resposta inicial ao *T. gondii* IFN- γ e TNF são produzidos (SASAI *et al.*, 2018). Também já foi descrito que IFN- γ induz a produção de TNF (CHANG *et al.*, 1990), isso poderia explicar os altos níveis de TNF encontrados nas amostras séricas dos animais infectados por ambas as cepas, enquanto nas amostras de sobrenadante encefálico não foram encontrados títulos de TNF, sugerindo que a resposta no SNC contra *T. gondii* ainda levaria a produção de TNF em momentos posteriores.

A letalidade em camundongos infectados com *T. gondii* pode ser atribuída à incapacidade do organismo em conter a replicação do parasito ou por meio da “tempestade de citocinas”, que levam a lesões teciduais graves, conforme demonstrado que em camundongos deficientes de IL-10, havia superprodução de IFN- γ e TNF, além de patologia hepática aumentada caracterizada por infiltração celular e necrose, o que os sucumbia a morte (GAZZINELLI *et al.*, 1996). A IL-10 desempenha um papel importante na regulação de respostas do tipo *Th1*, suprimindo-as e prevenindo processos patológicos. Já foi descoberto que a IL-10 era crítica para a sobrevivência do hospedeiro, de forma que sua deficiência desencadeou uma resposta inflamatória sistêmica notavelmente alta (KHAN & MORETTO, 2022; DOHERTY *et al.*, 2024). Nossos dados mostraram que, em amostras de sobrenadante encefálico do grupo controle, os títulos de IL-10, embora baixos, eram mais detectáveis em comparação aos dos grupos de animais infectados. Esses achados sugerem uma possível regulação negativa das respostas anti-inflamatórias mediadas pela infecção por *T. gondii*. Ainda que tenha sido detectado a presença de IL-10 no soro do grupo infectado por Tgcatbr5, não foram títulos considerados significativamente diferentes do grupo não infectado (Figura 23A). Sobretudo, já foi observado que mesmo presente, a IL-10 não teve atividade na regulação negativa da expressão de MCP-1, fator pró-inflamatório (DEL RIO *et al.*, 2004), o que corrobora com nossos dados com a presença de altos níveis de MCP-1 em ambas amostras analisadas de animais infectados por Tgcatbr5. Além disso, foi demonstrado que *T. gondii* pode atuar inibindo a superindução de IL-10 em macrófagos ativados ao interferir na região promotora do gene codificador de IL-10, mas não inibe a indução de baixo nível de IL-10 (LENG & DENKERS, 2009). De fato, na perspectiva do parasito, menores concentrações de IL-10 são importantes para que ele consiga se replicar ao mesmo tempo que mantem o hospedeiro vivo e, assim, maximiza as chances de transmissão.

Altas concentrações de MCP-1 foram encontradas nas amostras referente a infecção por Tgcatbr5, mas não em amostras referentes a infecção por ME49. Níveis elevados de MCP-1 foram associados a mortalidade de camundongos infectados com *T. gondii* (ALONAIKAN *et al.*, 2021). Foi observado que a superestimulação de células imunes ao padrão *Th1* e os níveis extremos de IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-18 são uns dos fatores associados a letalidade observada em camundongos infectados pela cepa RH (MORDUE *et al.*, 2001). Diante de nossos dados, podemos incluir a

MCP-1 como um dos elementos associados a virulência aumentada de Tgcatbr5, que leva ao óbito de camundongos infectados.

Astrócitos ativados produzem MCP-1, além da micróglia e células imunes infiltrantes. Conforme as quimiocinas aumentam no tecido, mais células são atraídas e se infiltram no parênquima cerebral (ORCHANIAN *et al.*, 2024). Desta forma, os altos títulos de MCP-1 tanto a nível sistêmico (Figura 21A), como local (Figura 21B), na infecção por Tgcatbr5, validam a presença de focos inflamatórios encontrados no córtex destes animais. Além disso, foi demonstrado que a MCP-1 é expressa nos cérebros de pacientes com demência associada ao HIV-1 (CONANT *et al.*, 1998). Desta forma, a infiltração monocítica pode contribuir substancialmente para a demência, sendo a infecção por Tgcatbr5 um fator que pode se associar a tal condição.

É amplamente reconhecido que a IL-12 é uma citocina produzida por APC's e é liberada logo após a infecção por *T. gondii*, atuando de forma a estimular a produção de IFN- γ (KHAN & MORETTO, 2022). Em nossos experimentos, o resultado negativo quanto a detecção de IL-12 p70 (Figura 20) pode ser devido ao tempo de análise. É possível que a IL-12 p70 tenha sido produzida e desempenhado sua função nos dias iniciais pi, tendo apenas níveis basais para detecção durante a análise. Já a IL-6, uma importante citocina envolvida no controle da replicação do parasito, tem papel pleotrópico, podendo atuar como pró-inflamatória ou anti-inflamatória, a depender do contexto e célula envolvida (PEPPLER *et al* 2020). Os macrófagos são a principal fonte de IL-6 em respostas inflamatórias, além disso, ela também já se mostrou envolvida na mobilização de células da periferia até o SNC durante a infecção por *T. gondii* e no estímulo à produção de IFN- γ (SUZUKI *et al.*, 1997). Por outro lado, um estudo demonstrou que ao infectar a célula hospedeira, *T. gondii* induz a expressão de STAT3, um fator de transcrição associado a uma produção prejudicada de citocinas pro-inflamatórias. Curiosamente, este mesmo fator é ativado por IL-6, de forma antagonizar funções antimicrobianas (WHITMARSH *et al.*, 2011). Desta forma, é complexo afirmar como IL-6 atua na infecção por *T. gondii*, entretanto, avaliando o contexto da presença de uma forte polarização da resposta imune à inflamação na infecção por Tgcatbr5 é possível que a sua presença esteja corroborando para tal resposta.

A cinética de produção de citocinas e quimiocinas na infecção de *T. gondii* em modelo murino foi pesquisada em amostras de plasma e os resultados revelaram que a produção de TNF foi iniciada no dia 5 pi, com pico em 10 dias e decaimento em 20 dias, já a MCP-1 atingiu o pico no dia 5 pi e se manteve relativamente alta até o fim do experimento, enquanto os níveis de IL-6, IL-10 e IL-12 p70 não se elevaram de forma significativa (AVILES *et al.*, 2008). Esses achados reforçam nossos resultados e demonstram que a infecção por *T. gondii* é tipicamente pró-inflamatória independente da cepa infectante, sendo a intensidade das respostas um fator determinante para letalidade. Desta forma, pode-se concluir que o início de um processo neuroinflamatório observado foi potencialmente responsável por alterações comportamentais, como a hiperatividade encontrada nos animais infectados por Tgcatbr5 e é sustentada por altos títulos de citocinas pró-inflamatórias tanto intracerebrais quanto periféricas, bem como a quimiocina MCP-1, que promovem o recrutamento de células inflamatórias, criando um ambiente posteriormente fatal.

A dosagem de neurotransmissores a partir do tecido cerebral e o uso da técnica de imuno-histoquímica para marcação de ativação microglial (anti-Iba1), astrócitos reativos (anti-GFAP) neurodegeneração (anti-NeuN) são passos complementares para melhor compreensão acerca de como o parasito age no SNC de forma a contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas capazes de impedir a progressão ou reverter desordens neuropsicológicas associadas à infecção por *T. gondii*.

8. CONCLUSÃO

Foi realizada a padronização de quantidade de inóculo ideal para que fosse possível avaliar a fase aguda de infecção por uma cepa virulenta de *T. gondii*, sendo observado que o inóculo de 1×10^3 leva os animais ao óbito apenas a partir do 10º dia pós infecção. Além disso, foi observado nos testes de virulência que infecção por Tgcatbr5 leva a redução significativa do peso corporal e que o óbito no modelo murino é inevitável independentemente da quantidade de inóculo utilizada. Ainda que os animais infectados no experimento central não tenham tido títulos significativos de IgM, nós fornecemos sinais evidentes da infecção por *T. gondii* ao observar diferenças nos testes comportamentais e histologia, além dos altos níveis de citocinas pró-inflamatórias encontradas nas amostras de animais infectados por ambas as cepas, mas ausente nos animais controle.

A resposta desencadeada por Tgcatbr5 foi tipicamente pró-inflamatória com elevada quantidade de IFN- γ , MCP-1, TNF e IL-6 em amostras séricas e IFN- γ , MCP-1 em amostras de sobrenadante encefálico, o que revela que a resposta sistêmica e local são similares. Ainda que a cepa ME49 também direcione a uma resposta pró-inflamatória, a intensidade de resposta à infecção foi distinta e este é um fator ligado a mortalidade no modelo murino. Os expressivos títulos de citocinas pró-inflamatórias no parênquima cerebral associados a presença de infiltrado inflamatório no córtex pré-frontal reforçaram a literatura que o parasito acessa o SNC, leva a processos inflamatórios e estes podem gerar alterações no comportamento

Foi descrito que a infecção pela cepa Tgcatbr5 leva a alterações comportamentais significativas no modelo murino, como redução de respostas associadas à medo e hiperlocomoção. Além disso, conseguimos estabelecer uma correlação direta entre a resposta imunológica e alterações comportamentais. Os comportamentos observados não diferem do que é comumente descrito na literatura, concluindo que *T. gondii*, independente da cepa, age em regiões semelhantes para modular o comportamento do hospedeiro.

As alterações comportamentais observadas apontam que a infecção por Tgcatbr5 pode ser um fator contribuinte para indivíduos propensos ao desenvolvimento de esquizofrenia, devido a hiperlocomoção observada no teste do

CA e a sua relação com a neurotransmissão dopaminérgica, demência, devido ao aumento observado da quimiocina MCP-1 em ambas amostras analisadas e a relação da contribuição de infiltrado monocítico nesta doença, e depressão, devido ao aumento de IFN- γ e IL-6 encontrado, visto que o aumento destas citocinas teve relação direta a presença de comportamentos depressivos. A alta concentração de MCP-1, a nível sistêmico e local, foi o diferencial encontrado na infecção por Tgcatbr5, e foi diretamente relacionada a virulência e letalidade observada. Por outro lado, não foi demonstrada relação entre níveis de NO e processos inflamatórios no SNC, o que sugere que a presença de NO não é um fator contribuinte para neuroinflamação e alterações no comportamento de animais infectados por *T. gondii*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chen, J., Li, Z. Y., Zhou, D. H., Liu, G. H., & Zhu, X. Q. (2012). Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* strains from different hosts and geographical regions revealed by sequence analysis of GRA5 gene. *Parasites & vectors*, 5, 279.

Abdulai-Saiku, S., Hegde, A., Vyas, A., & Mitra, R. (2017). Effects of stress or infection on rat behavior show robust reversals due to environmental disturbance. *F1000Research*, 6, 2097.

Alonaizan, R., Woods, S., Hargrave, K. E., & Roberts, C. W. (2021). An Exaggerated Immune Response in Female BALB/c Mice Controls Initial *Toxoplasma gondii* Multiplication but Increases Mortality and Morbidity Relative to Male Mice. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1154.

Amendoeira, M.R.R & Costa, T. DA. (1999). *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. *Revista Souza Marques*, v. 1, n. 1.

Anderson, C., Zuckerwise, A., Wallace, R. B., Ayala, G., Viscarra, M., & Schmitz, O. J. (2024). Small Felids Coexist in Mixed-Use Landscape in the Bolivian Amazon. *Animals: an open access journal from MDPI*, 14(5), 697.

Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., De Souza, W. et al. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & vectors* v. 13,1 588.

Aviles, H., Stiles, J., O'Donnell, P., Orshal, J., Leid, J., Sonnenfeld, G., & Monroy, F. (2008). Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine toxoplasma infection. *The Journal of parasitology*, 94(6), 1282–1288.

Bahreini, M. S., Nohtani, M., Salemi, A. M., Mirzaeipour, M., Dastan, N., Bajelan, S., & Asgari, Q. (2021). Introduction of protocols for mass production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites of the genotype II PRU strain. *Animal models and experimental medicine*, 4(3), 278–282.

Bergersen, K. V., Barnes, A., Worth, D., David, C., & Wilson, E. H. (2021). Targeted Transcriptomic Analysis of C57BL/6 and BALB/c Mice During Progressive

Chronic *Toxoplasma gondii* Infection Reveals Changes in Host and Parasite Gene Expression Relating to Neuropathology and Resolution. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 645778.

Bezerra, E. C. M., Dos Santos, S. V., Dos Santos, T. C. C., de Andrade, H. F., Junior, & Meireles, L. R. (2019). Behavioral evaluation of BALB/c (*Mus musculus*) mice infected with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. *Microbial pathogenesis*, 126, 279–286.

Biswas, A., Bruder, D., Wolf, S. A., Jeron, A., Mack, M., Heimesaat, M. M., & Dunay, I. R. (2015). Ly6C(high) monocytes control cerebral toxoplasmosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:1950)*, 194(7), 3223–3235.

Boillat, M., Hammoudi, P. M., Dogga, S. K., Pagès, S., Goubran, M., Rodriguez, I., & Soldati-Favre, D. (2020). Neuroinflammation-Associated Aspecific Manipulation of Mouse Predator Fear by *Toxoplasma gondii*. *Cell reports*, 30(2), 320–334.e6.

Brito, R. M. M., da Silva, M. C. M., Vieira-Santos, F., de Almeida Lopes, C., Souza, J. L. N., Bastilho, A. L., de Barros Fernandes, H., de Miranda, A. S., de Oliveira, A. C. P., de Almeida Vitor, R. W., de Andrade-Neto, V. F., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., & Magalhães, L. M. D. (2023). Chronic infection by atypical *Toxoplasma gondii* strain induces disturbance in microglia population and altered behaviour in mice. *Brain, behavior, & immunity - health*, 30, 100652.

Brito, R. M. M., de Lima Bessa, G., Bastilho, A. L., Dantas-Torres, F., de Andrade-Neto, V. F., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., & Magalhães, L. M. D. (2023). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in South America: occurrence, immunity, and fate of infection. *Parasites & vectors*, 16(1), 461.

Brown, C. R., Hunter, C. A., Estes, R. G., Beckmann, E., Forman, J., David, C., Remington, J. S., & McLeod, R. (1995). Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. *Immunology*, 85(3), 419–428.

Cabral, C. M., Tuladhar, S., Dietrich, H. K., Nguyen, E., MacDonald, W. R., Trivedi, T., Devineni, A., & Koshy, A. A. (2016). Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*, 12(2), e1005447.

Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., & Gould, T. D. (2012). The tail suspension test. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (59), e3769.

Carneiro, A. C., Andrade, G. M., Costa, J. G., Pinheiro, B. V., Vasconcelos-Santos, D. V., Ferreira, A. M., Su, C., Januário, J. N., & Vitor, R. W. (2013). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *Journal of clinical microbiology*, 51(3), 901–907.

Castaño Barrios, L., Da Silva Pinheiro, A. P., Gibaldi, D., Silva, A. A., Machado Rodrigues E Silva, P., Roffê, E., da Costa Santiago, H., Tostes Gazzinelli, R., Mineo, J. R., Silva, N. M., & Lannes-Vieira, J. (2021). 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*, 16(10), e0258199.

Cerutti, A., Blanchard, N., & Besteiro, S. (2020). The Bradyzoite: A Key Developmental Stage for the Persistence and Pathogenesis of Toxoplasmosis. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(3), 234.

Chang, H. R., Grau, G. E., & Pechère, J. C. (1990). Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology*, 69(1), 33–37.

Cheng, J. H., Xu, X., Li, Y. B., Zhao, X. D., Aosai, F., Shi, S. Y., Jin, C. H., Piao, J. S., Ma, J., Piao, H. N., Jin, X. J., & Piao, L. X. (2020). Arctigenin ameliorates depression-like behaviors in *Toxoplasma gondii*-infected intermediate hosts via the TLR4/NF- κ B and TNFR1/NF- κ B signaling pathways. *International immunopharmacology*, 82, 106302.

Cifuentes-González, C., Rojas-Carabali, W., Pérez, Á. O., Carvalho, É., Valenzuela, F., Miguel-Escuder, L., Ormaechea, M. S., Heredia, M., Baquero-Ospina, P., Adan, A., Curi, A., Schlaen, A., Urzua, C. A., Couto, C., Arellanes, L., & de-la-Torre, A. (2023). Risk factors for recurrences and visual impairment in patients with ocular toxoplasmosis: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 18(4), e0283845.

Conant, K., Garzino-Demo, A., Nath, A., McArthur, J. C., Halliday, W., Power, C., Gallo, R. C., & Major, E. O. (1998). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(6), 3117–3121.

Correa, D., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L. B., Caballero-Ortega, H., & Rico-Torres, C. P. (2007). Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite immunology*, 29(12), 651–660.

Costa, V. D., Tran, V. L., Turchi, J., & Averbeck, B. B. (2014). Dopamine modulates novelty seeking behavior during decision making. *Behavioral neuroscience*, 128(5), 556–566.

Damasceno-Sá, J. C., de Souza, F. S., Dos Santos, T. A. T., de Oliveira, F. C., da Silva, M. F. S., Dias, R. R. F., de Souza, W., Arnholdt, A. C. V., Seabra, S. H., & DaMatta, R. A. (2021). Inhibition of nitric oxide production of activated mice peritoneal macrophages is independent of the *Toxoplasma gondii* strain. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 116, e200417.

De Lima Bessa, G., de Almeida Vitor, R. W., & Dos Santos Martins-Duarte, E. (2021). *Toxoplasma gondii* in South America: a differentiated pattern of spread, population structure and clinical manifestations. *Parasitology research*, 120(9), 3065–3076.

De Souza, W. & Belfort, R. J. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii*. (2014). Editora Fiocruz.

Deganich, M., Boudreaux, C., & Benmerzouga, I. (2022). Toxoplasmosis Infection during Pregnancy. *Tropical medicine and infectious disease*, 8(1), 3.

Del Rio, L., Butcher, B. A., Bennouna, S., Hieny, S., Sher, A., & Denkers, E. Y. (2004). *Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(11), 6954–6960.

Dincel, G. C., & Atmaca, H. T. (2015). Nitric oxide production increases during *Toxoplasma gondii* encephalitis in mice. *Experimental parasitology*, 156, 104–112.

- Doherty, C. M., Patterson, P. R., Emeanuwa, J. A., Belmares Ortega, J., Fox, B. A., Bzik, D. J., & Denkers, E. Y. (2024). T lymphocyte-dependent IL-10 down-regulates a cytokine storm driven by *Toxoplasma gondii* GRA24. *mBio*, *15*(11), e0145524.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*, *67*(5), 446–457.
- Dubey, J. P., Ferreira, L. R., Martins, J., & McLeod, R. (2012). Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology*, *139*(1), 1–13.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, *11*(2), 267–299.
- Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., & Villena, I. (2021). Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology*, *148*(12), 1406–1416.
- Dubey, J. P., Navarro, I. T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R. L., Kawabata, H. H., Vianna, M. C., Kwok, O. C., Shen, S. K., Thulliez, P., & Lehmann, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *The Journal of parasitology*, *90*(4), 721–726.
- Dubey, J. P., Passos, L. M., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Gennari, S. M., & Su, C. (2011). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from feral guinea fowl (*Numida meleagris*) and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Brazil. *The Journal of parasitology*, *97*(5), 842–845.
- Eells, J. B., Varela-Stokes, A., Guo-Ross, S. X., Kummari, E., Smith, H. M., Cox, A. D., & Lindsay, D. S. (2015). Chronic *Toxoplasma gondii* in Nurr1-null heterozygous mice exacerbates elevated open field activity. *PloS one*, *10*(4), e0119280.
- Evangelista, F. F., Costa-Ferreira, W., Mantelo, F. M., Beletini, L. F., de Souza, A. H., de Laet Sant'Ana, P., de Lima, K. K., Crestani, C. C., & Falavigna-Guilherme, A. L. (2021). Rosuvastatin revert memory impairment and angiogenic-like effect in mice

infected with the chronic ME-49 strain of *Toxoplasma gondii*. *PloS one*, 16(4), e0250079.

Evangelista, F. F., de Laet Sant'Ana, P., Ferreira, W. C., Ferreira, T. A., Dos Santos, M. L., de Souza, A. H., de Andrade, F. A. L., da Silva, D. A., de Barros, L. D., Colli, C. M., Nogueira-Melo, G. A., Costa, I. N., & Falavigna-Guilherme, A. L. (2023). The Brazilian *Toxoplasma gondii* strain BRI caused greater inflammation and impairment in anxiogenic behavior in mice, which was reverted by rosuvastatin treatment. *Parasitology research*, 123(1), 64.

Evans, R., Chatterton, J. M., Ashburn, D., Joss, A. W., & Ho-Yen, D. O. (1999). Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 18(12), 879–884.

Eyre, H. A., Papps, E., & Baune, B. T. (2013). Treating depression and depression-like behavior with physical activity: an immune perspective. *Frontiers in psychiatry*, 4, 3.

Ferguson, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. (2009). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 104,2.

Ferreira, A. M., Martins, M. S., & Vitor, R. W. (2001). Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite (Paris, France)*, 8(2), 99–105.

Ferreira, A. de M., Vitor, R. W., Gazzinelli, R. T., & Melo, M. N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 6(1), 22–31.

Fisch, D., Clough, B., & Frickel, E. M. (2019). Human immunity to *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*, 15(12), e1008097.

Flegr J. (2013). How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends in parasitology*, 29(4), 156–163.

Flegr J. (2013). Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in

studying the manipulation hypothesis. *The Journal of experimental biology*, 216(Pt 1), 127–133.

Forrester, J. V., McMenamin, P. G., & Dando, S. J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature reviews. Neuroscience*, 19(11), 655–671.

Friedman, N. P., & Robbins, T. W. (2022). The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 47(1), 72–89.

Galal, L., Hamidović, A., Dardé, M. L., & Mercier, M. (2019). Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food and waterborne parasitology*, 15, e00052.

Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kühn, R., Müller, W., Trinchieri, G., & Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:1950)*, 157(2), 798–805.

Gilbert, R. E., Freeman, K., Lago, E. G., Bahia-Oliveira, L. M., Tan, H. K., Wallon, M., Buffolano, W., Stanford, M. R., Petersen, E., & European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT) (2008). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(8), e277.

Grigg, M. E., Ganatra, J., Boothroyd, J. C., & Margolis, T. P. (2001). Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases*, 184(5), 633–639.

Hermes, G., Ajioka, J. W., Kelly, K. A., Mui, E., Roberts, F., Kasza, K., Mayr, T., Kirisits, M. J., Wollmann, R., Ferguson, D. J., Roberts, C. W., Hwang, J. H., Trendler, T., Kennan, R. P., Suzuki, Y., Reardon, C., Hickey, W. F., Chen, L., & McLeod, R. (2008). Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection. *Journal of neuroinflammation*, 5, 48.

- Hill, R. D., & Su, C. (2012). High tissue burden of *Toxoplasma gondii* is the hallmark of acute virulence in mice. *Veterinary parasitology*, 187(1-2), 36–43.
- Himanshu, Dharmila, Sarkar, D., & Nutan (2020). A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. *Clinical psychopharmacology and neuroscience: the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 18(3), 341–351.
- Hou, B., Benson, A., Kuzmich, L., DeFranco, A. L., & Yarovinsky, F. (2011). Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 278–283.
- Hou, R., Garner, M., Holmes, C., Osmond, C., Teeling, J., Lau, L., & Baldwin, D. S. (2017). Peripheral inflammatory cytokines and immune balance in Generalised Anxiety Disorder: Case-controlled study. *Brain, behavior, and immunity*, 62, 212–218.
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of infectious diseases*, 172(6), 1561–1566.
- Howe, D. K., Honoré, S., Derouin, F., & Sibley, L. D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 35(6), 1411–1414.
- Howes, O. D., Bukala, B. R., & Beck, K. (2024). Schizophrenia: from neurochemistry to circuits, symptoms and treatments. *Nature reviews. Neurology*, 20(1), 22–35.
- Hunter, C. A., & Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature reviews. Microbiology*, 10(11), 766–778.
- Johnson, J., Suzuki, Y., Mack, D., Mui, E., Estes, R., David, C., Skamene, E., Forman, J., & McLeod, R. (2002). Genetic analysis of influences on survival following *Toxoplasma gondii* infection. *International journal for parasitology*, 32(2), 179–185.
- Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and barriers of the CNS*, 17(1), 69.

- Kaushik, M., Knowles, S. C., & Webster, J. P. (2014). What makes a feline fatal in *Toxoplasma gondii*'s fatal feline attraction? Infected rats choose wild cats. *Integrative and comparative biology*, *54*(2), 118–128.
- Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J. P., Darde, M. L., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2007). Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(37), 14872–14877.
- Khan, A., Su, C., German, M., Storch, G. A., Clifford, D. B., & Sibley, L. D. (2005). Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *Journal of clinical microbiology*, *43*(12), 5881–5887.
- Khan, I. A., & Moretto, M. (2022). Immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Current opinion in immunology*, *77*, 102226.
- Kochanowsky, J. A., & Koshy, A. A. (2018). *Toxoplasma gondii*. *Current biology: CB*, *28*(14), R770–R771.
- Komada, M., Takao, K., & Miyakawa, T. (2008). Elevated plus maze for mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (22), 1088.
- Konradt, C., Ueno, N., Christian, D. A., Delong, J. H., Pritchard, G. H., Herz, J., Bzik, D. J., Koshy, A. A., McGavern, D. B., Lodoen, M. B., & Hunter, C. A. (2016). Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nature microbiology*, *1*, 16001.
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1916*, 105–111.
- Laing, C., Blanchard, N., & McConkey, G. A. (2020). Noradrenergic Signaling and Neuroinflammation Crosstalk Regulate *Toxoplasma gondii*-Induced Behavioral Changes. *Trends in immunology*, *41*(12), 1072–1082.
- Leng, J., & Denkers, E. Y. (2009). *Toxoplasma gondii* inhibits covalent modification of histone H3 at the IL-10 promoter in infected macrophages. *PloS one*, *4*(10), e7589.

- Li, L., Kang, Y. X., Ji, X. M., Li, Y. K., Li, S. C., Zhang, X. J., Cui, H. X., & Shi, G. M. (2018). Finasteride inhibited brain dopaminergic system and open-field behaviors in adolescent male rats. *CNS neuroscience & therapeutics*, *24*(2), 115–125.
- Li, Y., Severance, E. G., Viscidi, R. P., Yolken, R. H., & Xiao, J. (2019). Persistent *Toxoplasma* Infection of the Brain Induced Neurodegeneration Associated with Activation of Complement and Microglia. *Infection and immunity*, *87*(8), e00139-19.
- Lueptow L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (126), 55718.
- Matta, S. K., Rinkenberger, N., Dunay, I. R., & Sibley, L. D. (2021). *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nature reviews. Microbiology*, *19*(7), 467–480.
- McAuley J. B. (2014). Congenital Toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, *3 Suppl 1*(Suppl 1), S30–S35.
- McConkey, G. A., Martin, H. L., Bristow, G. C., & Webster, J. P. (2013). *Toxoplasma gondii* infection and behaviour - location, location, location?. *The Journal of experimental biology*, *216*(Pt 1), 113–119.
- McTeague, L. M., Goodkind, M. S., & Etkin, A. (2016). Transdiagnostic impairment of cognitive control in mental illness. *Journal of psychiatric research*, *83*, 37–46.
- Meireles, L. R., Bezerra, E. C. M., Andrade, J. Q., Cassiano, L. A., Pena, H. F. J., Alves, B. F., Francisco, R. P. V., & de Andrade, H. F., Jr (2022). Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from human congenital toxoplasmosis cases reveal a new virulent genotype in São Paulo, Brazil. *Parasitology research*, *121*(11), 3223–3228.
- Mendez, O. A., & Koshy, A. A. (2017). *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS pathogens*, *13*(7), e1006351.
- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature reviews. Immunology*, *16*(1), 22–34.

- Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A., & Sibley, L. D. (2001). Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *167*(8), 4574–4584.
- Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., & Tanaka, J. (2002). Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, *43*(6), 1026–1034.
- Mukhopadhyay, D., Arranz-Solís, D., & Saeij, J. P. J. (2020). Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During *Toxoplasma* Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 580425.
- Nayeri, T., Sarvi, S., Sharif, M., & Daryani, A. (2021). *Toxoplasma gondii*: A possible etiologic agent for Alzheimer's disease. *Heliyon*, *7*(6), e07151.
- Nguyen, T. D., Bigaignon, G., Markine-Goriaynoff, D., Heremans, H., Nguyen, T. N., Warnier, G., Delmee, M., Warny, M., Wolf, S. F., Uyttenhove, C., Van Snick, J., & Coutelier, J. P. (2003). Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. *Journal of medical microbiology*, *52*(Pt 10), 869–876.
- Orchanian, S. B., Still, K., Harris, T. H., & Lodoen, M. B. (2024). Deficiency in astrocyte CCL2 production reduces neuroimmune control of *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS pathogens*, *20*(1), e1011710.
- Patel A. (2013). Review: the role of inflammation in depression. *Psychiatra Danubina*, *25 Suppl 2*, S216–S223.
- Peppler, W. T., Townsend, L. K., & Wright, D. C. (2020). Recent advances in the role of interleukin-6 in health and disease. *Current opinion in pharmacology*, *52*, 47–51.
- Prandovszky, E., Gaskell, E., Martin, H., Dubey, J. P., Webster, J. P., & McConkey, G. A. (2011). The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PLoS one*, *6*(9), e23866.
- Rozenfeld, C., Martinez, R., Figueiredo, R. T., Bozza, M. T., Lima, F. R., Pires, A. L., Silva, P. M., Bonomo, A., Lannes-Vieira, J., De Souza, W., & Moura-Neto, V. (2003). Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate

nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. *Infection and immunity*, 71(4), 2047–2057.

Sana, M., Rashid, M., Rashid, I., Akbar, H., Gomez-Marin, JE, & Dimier-Poisson, I. (2022). Resposta imune contra toxoplasmose - algumas atualizações recentes RH: resposta imune de *Toxoplasma gondii*. *Revista internacional de imunopatologia e farmacologia*, 36, 3946320221078436.

Sanchez, S. G., & Besteiro, S. (2021). The pathogenicity and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Virulence*, 12(1), 3095–3114.

Saraf, P., Shwab, E. K., Dubey, J. P., & Su, C. (2017). On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Experimental parasitology*, 174, 25–30.

Sasai, M., Pradipta, A., & Yamamoto, M. (2018). Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *International immunology*, 30(3), 113–119.

Schlüter, D., Kaefer, N., Hof, H., Wiestler, O. D., & Deckert-Schlüter, M. (1997). Expression pattern and cellular origin of cytokines in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brain. *The American journal of pathology*, 150(3), 1021–1035.

Schneider, C. A., Figueroa Velez, D. X., Azevedo, R., Hoover, E. M., Tran, C. J., Lo, C., Vadpey, O., Gandhi, S. P., & Lodoen, M. B. (2019). Imaging the dynamic recruitment of monocytes to the blood-brain barrier and specific brain regions during *Toxoplasma gondii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(49), 24796–24807.

Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453–461.

Sibley L. D. (2010). How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Current opinion in biotechnology*, 21(5), 592–598.

Strack, A., Asensio, V. C., Campbell, I. L., Schlüter, D., & Deckert, M. (2002). Chemokines are differentially expressed by astrocytes, microglia and inflammatory leukocytes in *Toxoplasma* encephalitis and critically regulated by interferon-gamma. *Acta neuropathologica*, 103(5), 458–468.

- Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., & Sibley, L. D. (2003). Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5605), 414–416.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Zhu, X. Q., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(15), 5844–5849.
- Sutherland, A. L., Fond, G., Kuin, A., Koeter, M. W., Lutter, R., van Gool, T., Yolken, R., Szoke, A., Leboyer, M., & de Haan, L. (2015). Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. *Acta psychiatrica Scandinavica*, *132*(3), 161–179.
- Suzuki, Y., Sa, Q., Gehman, M., & Ochiai, E. (2011). Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. *Expert reviews in molecular medicine*, *13*, e31.
- Suzuki, Y., Sher, A., Yap, G., Park, D., Neyer, L. E., Liesenfeld, O., Fort, M., Kang, H., & Gufwoli, E. (2000). IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *164*(10), 5375–5382.
- Tatsch, E., Bochi, G. V., Pereira, R.daS., Kober, H., Agertt, V. A., de Campos, M. M., Gomes, P., Duarte, M. M., & Moresco, R. N. (2011). A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clinical biochemistry*, *44*(4), 348–350.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., Beatty, W. L., Hajj, H. E., Jerome, M., Behnke, M. S., White, M., Wootton, J. C., & Sibley, L. D. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5806), 1776–1780.
- Tong, W. H., Pavey, C., O'Handley, R., & Vyas, A. (2021). Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. *Parasites & vectors*, *14*(1), 77.

- Torres, L., Robinson, S. A., Kim, D. G., Yan, A., Cleland, T. A., & Bynoe, M. S. (2018). *Toxoplasma gondii* alters NMDAR signaling and induces signs of Alzheimer's disease in wild-type, C57BL/6 mice. *Journal of neuroinflammation*, *15*(1), 57.
- Tsitsiklis, A., Bangs, D. J., & Robey, E. A. (2019). CD8⁺ T Cell Responses to *Toxoplasma gondii*: Lessons from a Successful Parasite. *Trends in parasitology*, *35*(11), 887–898.
- Vidal, J. E., Hernandez, A. V., de Oliveira, A. C., Dauar, R. F., Barbosa, S. P., Jr, & Focaccia, R. (2005). Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS patient care and STDs*, *19*(10), 626–634.
- Villegas-Rivera, G., Román-Pintos, L. M., Cardona-Muñoz, E. G., Arias-Carvajal, O., Rodríguez-Carrizalez, A. D., Troyo-Sanromán, R., Pacheco-Moisés, F. P., Moreno-Ulloa, A., & Miranda-Díaz, A. G. (2015). Effects of Ezetimibe/Simvastatin and Rosuvastatin on Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2015*, 756294.
- Virus, M. A., Ehrhorn, E. G., Lui, L. M., & Davis, P. H. (2021). Neurological and Neurobehavioral Disorders Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Humans. *Journal of parasitology research*, *2021*, 6634807.
- Vyas, A., Kim, S. K., Giacomini, N., Boothroyd, J. C., & Sapolsky, R. M. (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(15), 6442–6447.
- Wana, M. N., Watanabe, M., Chiroma, S. M., Unyah, N. Z., Abdullahi, S. A., Nordin, S., Basir, R., Mohd Moklas, M. A., & Majid, R. A. (2023). *Toxoplasma gondii* induced cognitive impairment in rats via dysregulation of dopamine receptors and indoleamine 2,3 dioxygenase. *Heliyon*, *9*(3), e14370.
- Wang, T., Sun, X., Qin, W., Zhang, X., Wu, L., Li, Y., Zhou, C., Zhou, H., He, S., & Cong, H. (2019). From inflammatory reactions to neurotransmitter changes: Implications for understanding the neurobehavioral changes in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Behavioural brain research*, *359*, 737–748.

Whitmarsh, R. J., Gray, C. M., Gregg, B., Christian, D. A., May, M. J., Murray, P. J., & Hunter, C. A. (2011). A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. *Cell host & microbe*, *10*(3), 224–236.

Xiao, J., Li, Y., Prandovszky, E., Kannan, G., Viscidi, R. P., Pletnikov, M. V., & Yolken, R. H. (2016). Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Toxoplasmosis Are Associated with MAG1 Antibody Levels and Cyst Burden. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(4), e0004674.

Xiao, J., Prandovszky, E., Kannan, G., Pletnikov, M. V., Dickerson, F., Severance, E. G., & Yolken, R. H. (2018). *Toxoplasma gondii*: Biological Parameters of the Connection to Schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, *44*(5), 983–992.

Young, J., Dominicus, C., Wagener, J., Butterworth, S., Ye, X., Kelly, G., Ordan, M., Saunders, B., Instrell, R., Howell, M., Stewart, A., & Treeck, M. (2019). A CRISPR platform for targeted in vivo screens identifies *Toxoplasma gondii* virulence factors in mice. *Nature communications*, *10*(1), 3963.

Zhao, X. Y., & Ewald, S. E. (2020). The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. *The Journal of clinical investigation*, *130*(7), 3370–3380.

Zhao, X. Y., Lempke, S. L., Urbán Arroyo, J. C., Brown, I. G., Yin, B., Magaj, M. M., Holness, N. K., Smiley, J., Redemann, S., & Ewald, S. E. (2024). iNOS is necessary for GBP-mediated *T. gondii* clearance in murine macrophages via vacuole nitration and intravacuolar network collapse. *Nature communications*, *15*(1), 2698.

ANEXO 1

Autorização da Comissão de Ética de Uso de Animais – CEUA UENF.



Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

REITORIA
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 563, intitulado “NEUROIMUNOMODULAÇÃO NA TOXOPLASMOSE: COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS TÍPICAS E ATÍPICAS CISTOGÊNICAS DE TOXOPLASMA GONDII EM MODELO MURINHO” sob a responsabilidade da Dra. Alba Lucinia Peixoto Rangel, Centro de Biociências e Biotecnológica da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 15/06/2023 como um aditivo ao protocolo nº 385. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 15/06/2027.

Campos dos Goytacazes, 15 de junho de 2023.

Clóvis de Paula Santos

Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais



Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
Tel.: (22) 2739-4178 - (22) – 2739-7180 correio eletrônico: adrianafaria@uenf.br