

**NEUROTOXOPLASMOSE MURINA: DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL E PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS IMUNOFISIOLÓGICOS SISTÊMICOS E CEREBRAIS**

LUIZA GONÇALVES AYRES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2020

**NEUROTOXOPLASMOSE MURINA: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E
PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
IMUNOFISIOLÓGICOS SISTÊMICOS E CEREBRAIS**

LUIZA GONÇALVES AYRES

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 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A985

Ayres, Luiza Gonçalves.

Neurotoxoplasmose murina : delineamento experimental e padronização de técnicas de avaliação de parâmetros imunofisiológicos sistêmicos e cerebrais. / Luiza Gonçalves Ayres. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

60 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2020.

Orientadora: Alba Lucinia Peixoto Rangel.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. neuroimunomodulação. 3. cepas típicas e atípicas. 4. BALB/c. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

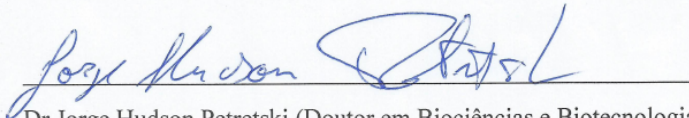
**NEUROTOXOPLASMOSE MURINA: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E
PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
IMUNOFISIOLÓGICOS SISTÊMICOS E CEREBRAIS**

LUIZA GONÇALVES AYRES

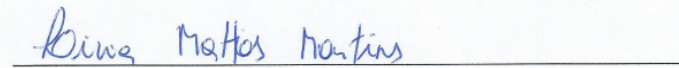
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020.

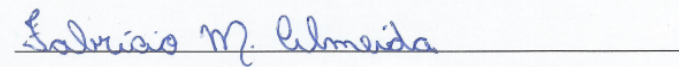
Banca examinadora:



Dr Jorge Hudson Petretski (Doutor em Biociências e Biotecnologia pela UENF) -
LBR/UENF



Drª Livia Mattos Martins (Doutora em Biociências e Biotecnologia pela UENF) -
FAMESC – Bom Jesus do Itabapoana



Dr Fabrício Moreira Almeida (Doutor em Biociências e Biotecnologia pela UENF) -
LBR/UENF

Orientadora: Alba Lucínia Peixoto Rangel (Doutora em Biociências e Biotecnologia pela UENF)

**NEUROTOXOPLASMOSE MURINA: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E
PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
IMUNOFISIOLÓGICOS SISTÊMICOS E CEREBRAIS**

LUIZA GONÇALVES AYRES

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 19 de fevereiro de 2020.

Banca examinadora:

Dr Jorge Hudson Petretski (Doutor em Biociências e Biotecnologia pela UENF) -
LBR/UENF

Dr^a Livia Mattos Martins (Doutora em Biociências e Biotecnologia pela UENF) -
FAMESC – Bom Jesus do Itabapoana

Dr Fabrício Moreira Almeida (Doutor em Biociências e Biotecnologia pela UENF) -
LBR/UENF

Orientadora: Alba Lucínia Peixoto Rangel (Doutora em Biociências e Biotecnologia pela UENF)

Para achar a solução continue a nadar.

Dory

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu noivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem Ele eu não teria conseguido chegar até aqui.

A João Luiz, Rita e Samuel, que sempre me apoiam a crescer intelectualmente e sempre me dão a base que eu preciso.

A Álvaro que sempre consegue fazer com que eu me sinta melhor, mesmo quando tudo está dando errado.

A minha célula, que sempre me sustenta em oração.

A família LBR que eu conheci aqui na UENF, todos os alunos, técnicos e professores, vocês são maravilhosos.

A Rebeka, que desde o início foi uma irmã de alma que encontrei.

A Letícia, que sempre usa seu divertimento para alegrar os dias.

Ao Yuri, minha dupla de mestrado, que mesmo com todo o seu jeito alvoroçado, me cativou.

A Milena, que sempre esteve comigo desde o início do experimento, aprendemos muito juntas.

A Bárbara, que sempre fez o que pode para me ajudar em tudo sem medir esforços.

A Fernanda e a Juliana, por sempre estarem por perto me dando esperanças.

A Juju, por incansáveis horas de experimento e por sentir as minhas dores de frustrações.

A Lili pela atenção e suporte no laboratório.

A Núbia por toda ajuda com as coletas e contenções dos animais.

A Ana Paula, por me ver me arrastando pelos corredores e sempre ter uma palavra de ânimo.

A professora Alba, por todo tempo e investimento em mim.

Muito obrigada a todos vocês, serei eternamente grata!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	19
2.2 Subpopulações de <i>T. gondii</i> e distribuição geográfica	21
2.3 Aspectos neurofisiológicos na infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	22
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo Geral	28
4.2 Objetivos Específicos	28
5 MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Comissão de Ética	29
5.2 Animais	29
5.3 Manutenção das cepas e preparação dos inóculos	29
5.4 Delineamento experimental das infecções com as cepas típicas e atípicas de <i>T. gondii</i> ..	30
5.5 Avaliação da soroconversão por detecção de IgG anti- <i>T. gondii</i> no soro dos camundongos	
.....	30
5.5.1 Lisado proteico de <i>T. gondii</i> a partir de cepa RH	30
5.5.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	31
5.5.3 Padronização da Marcação Fenotípica de Células Sistêmicas e Cerebrais de	
Camundongos	32
5.5.4 Padronização do Método de Griess para Dosagem de Óxido Nítrico Sistêmico e Cerebral	
de Camundongos	33
5.5.5 Coleta de sangue periférico	34
5.2 Análises estatísticas	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Delineamento experimental	36

6.1.1 Avaliação da soroconversão por detecção de IgG anti- <i>T. gondii</i> no soro dos camundongos	36
6.1.2 Microscopia óptica	37
6.1.5 Citometria de Fluxo	41
7 DISCUSSÃO	49
8 CONCLUSÕES	52
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ABREVIACOES

APP - Amyloid Precursor Protein (Proteína Precursora amielide)

BrI – Linhagem de *Toxoplasma gondii*

BrII - Linhagem de *Toxoplasma gondii*

BrIII - Linhagem de *Toxoplasma gondii*

BrIV - Linhagem de *Toxoplasma gondii*

BSA (Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina))

CEUA - Comissão de tica no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal

DMEM F-12 - *Dubelcco`s Modified Essencial Medium* - Meio essencial modificado Dubelcco`s

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - Ensaio de Imuno-adsoro ligado a enzima

FIOCRUZ – Fundao Oswaldo Cruz

FITC – Fluoresceína Isotiocianato

GRA15 – Proteínas de Grânulos densos 15

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

IgG – Imunoglobulina G

IgG2a - Imunoglobulina G2a

IgG2b – Imunoglobulina G2b

LBR – Laboratório de Biologia do Reconhecer

ME-49 - Cepa clonal de *Toxoplasma gondii* tipo II

NK - Células *Natural Killer*

NO - *Nitric oxide* - Óxido nítrico

PBS - *Phosphate Buffered Saline* - Salina Fosfatada Tamponada

PBST - *Phosphate Buffered Saline with Tween 20* - Salina Fosfatada Tamponada com Tween 20

PRU - Cepa clonal de *Toxoplasma gondii* tipo II

RH - Cepa clonal de *Toxoplasma gondii* tipo I

ROP – Proteínas Róprias

SI – Sistema Imune

SNC – Sistema Nervoso Central

TCD3 – Linfócito TCD³

TCD4 Linfócito TCD⁴⁺

TCD8 Linfócito TCD⁸⁺

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

VEG – Cepa clonal de *Toxoplasma gondii* tipo III

RESUMO

O desenvolvimento de pesquisas que avaliam alterações comportamentais em animais infectados por *Toxoplasma gondii* demonstram que a infecção pode causar alterações em uma série de habilidades e capacidades, tais quais alterações locomotoras, ansiedade, divergência na aprendizagem e memória e perda do medo. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estabelecer delineamento experimental e padronização de técnicas de avaliação de parâmetros imunofisiológicos sistêmicos e cerebrais em camundongos BALB/c infectados com cepas típicas e atípicas de *T. gondii*. Para tanto, 120 camundongos isogênicos BALB/c machos de 8 semanas foram divididos em 5 grupos experimentais: 1) controle, 2) infectado por cepa típica tipo III VEG de *T. gondii*, 3) infectado por cepa típica tipo II ME-49 de *T. gondii*, 4) infectado por cepa atípica Isolado #19 galinha 060 de *T. gondii* e 5) infectado por cepa atípica Isolado #21 galinha 371 de *T. gondii*. Vinte semanas após a inoculação por gavagem das cepas de *T. gondii* ou PBS, todos os animais foram avaliados quanto a soroconversão para toxoplasmose por ELISA convencional. Somente animais da cepa ME-49 apresentaram soroconversão para toxoplasmose. No entanto, na avaliação por microscopia óptica de macerados de cérebro dos animais infectados pelas diferentes cepas, pudemos observar a presença de cistos teciduais de *T. gondii* nos animais infectados com as cepas ME-49, isolado #19 e isolado #21. Todos os animais foram acompanhados durante todo período após a infecção, tendo sido pesados semanalmente e observados quanto ao arrepio de pelos e consumo de água. Os animais infectados com todas as cepas (típicas e atípicas) apresentaram a característica pelo arrepiado e consumo elevado de água em relação aos animais controle. Padronização dos ensaios de avaliação dos parâmetros imunofisiológicos foi estabelecida para as metodologias de dosagem de óxido nítrico através do método de Griess e marcação de linfócitos TCD3/CD4, TCD4/CD69, TCD8/CD69, TCD8DX5, TCD8/CD25 e controles isotípicos IgG2b/IgG2a por citometria de fluxo. Também foi realizada a perfusão de animais para o preparo de tecido (cérebro) para imunohistoquímica. Nossos resultados apontam para a possibilidade dos testes sorológicos convencionais não apresentarem sensibilidade a determinadas cepas polimórficas circulantes em Campos dos Goytacazes e, provavelmente, em outros locais do hemisfério norte (Estados Unidos e Europa) onde tais testes são fabricados.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, neuroimunomodulação, cepas típicas e atípicas, BALB/C.

ABSTRACT

The development of research that evaluates behavioral changes in animals infected with *Toxoplasma gondii* shows that an infection can cause changes in a series of abilities and effects, such as locomotive changes, anxiety, divergence in learning and loss of fear. In this sense, this work aimed to define experimental design and standardization of techniques for assessing systemic and brain immunophysiological in BALB/c mice infected with typical and atypical strains of *T. gondii*. For this purpose, 120 eight-week BALB/c isometric mice were divided into 5 experimental groups: 1) control, 2) infected with a typical type III VEG strain of *T. gondii*, 3) infected with a typical type II ME-49 strain of *T. gondii*, 4) infected with atypical isolated strain #19 chicken 060 from *T. gondii* and 5) infected with atypical isolated strain #21 chicken 371 from *T. gondii*. 24 animals were infected orally (gavage). Twenty weeks after infection with *T. gondii* strains, all animals were subjected to seroconversion mice for toxoplasmosis by conventional ELISA. Only animals from the ME-49 strain found seroconversion to toxoplasmosis. However, in the light microscopy evaluation of brain macerates of animals infected by the different strains, we could observe the presence of *T. gondii* tissue cysts in animals infected with ME-49 strains, isolated #19 and isolated #21. All animals were followed throughout the period after infection, weighed weekly and observed for chills and water consumption. There were no applicable changes in relation to the weight of the animals in the different experimental groups related to the control. However, animals infected with all strains (typical and atypical) show chills and high water consumption compared to control animals. Standardization of evaluation tests of immunophysiological tests, which were used for nitric oxide measurement methods using the TCD3/CD4, TCD4/CD69, TCD8/CD69, TCD8/DX5, TCD8/CD25 and IgG2b/IgG2a isotypic control by flow cytometry. Animal perfusion was also performed to prepare tissue (brain) for immunohistochemistry. Our results point to the possibility that the serological tests allowed don't show sensitivity to the polymorphic strains circulating in Campos dos Goytacazes and, probably, in other places in the northern hemisphere (United States and Europe), where such tests are manufactured.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, neuroimmunomodulation, typical and atypical strains, BALB/c.

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) tem um ciclo de vida complexo envolvendo replicação sexual em membros da família dos felídeos (Felidae) e propagação assexuada em uma ampla variedade de hospedeiros de sangue quente (DUBEY, 2008). Existem três estágios infecciosos no ciclo de vida de *T. gondii*: taquizoítas, os quais facilitam a expansão durante infecção aguda; bradizoítas, os quais mantêm a infecção crônica por meio dos cistos teciduais e; esporozoítas, os quais são disseminados no ambiente dentro de oocistos (SIBLEY et al., 2009). Apesar de a infecção provocar uma forte resposta imune inata e adaptativa para controlar a multiplicação de parasitas, elas não a erradicam. Consequentemente, o hospedeiro infectado carrega consigo uma infecção latente ao longo da vida, caracterizada pela presença de cistos em seus tecidos. Os cistos teciduais se formam em uma variedade de células, especialmente células diferenciadas de vida longa, como neurônios e células musculares, garantindo assim uma infecção a longo prazo (SIBLEY et al., 2009). Nos seres humanos, a capacidade de *T. gondii* para o cérebro foi sugerido para explicar alguns transtornos mentais, incluindo esquizofrenia, alterações de personalidade, demência e tendências suicidas (BHADRA et al., 2013).

Em pacientes imunossuprimidos ou quando a infecção é primária com cepas altamente virulentas, o sistema imunológico não consegue controlar a replicação do parasita e a manifestação clínica da doença (FUENTES et al., 2001). Porém, no caso de hospedeiros saudáveis, a resposta imune do organismo consegue conter a multiplicação do parasita e eles se diferenciam de taquizoítas em bradizoítas, que é sua forma encistada e persistente no organismo. Esses cistos são caracterizados pela fase crônica da toxoplasmose, apresentam crescimento lento, podem sofrer reativação e voltar a fase aguda da doença posteriormente (PETERSEN E DUBEY, 2001).

O parasito *T. gondii*, através dos seus mecanismos de evasão, consegue contornar o sistema imune (SI) do hospedeiro e, com a sua ultrapassagem pelas barreiras biológicas, os seus cistos contendo bradizoítas permanecem no hospedeiro e tem preferência pelos sítios imunoprivilegiados (BARRAGAN E SIBLEY, 2002). Durante a fase aguda, esse protozoário se espalha rapidamente da sua região inicial de infecção do intestino para os tecidos secundários (DUBEY et al., 1997). E para que o processo de migração ocorra, o

parasito precisa romper e passar por várias barreiras, como o epitélio intestinal, circulação linfática e sanguínea (HARKER et al., 2015).

Os órgãos mais afetados pela migração do parasita são o cérebro, retina e placenta, locais que acabam sendo inacessíveis a vários outros tipos de patógenos (SIBLEY, 2010). E na hipótese de deficiência no sistema imune, esses cistos se transformam no seu estágio infectante, a forma taquizoíta, podendo causar a encefalite grave e outros sérios danos ao feto (LUFT E REMINGTON, 1992). Uma análise de distribuição de cistos de *T. gondii* e lesões histopatológicas em cérebro de camundongos infectados determinou que os parasitos estão dispersos por todo o órgão (BERENREITEROVA et al., 2011).

A neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia é uma área que estuda os mecanismos através dos quais o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) trocam informações, influenciando-se mutuamente, com evidentes implicações fisiológicas e patológicas (ALVES E PALERMO-NETO, 2007). De acordo com a definição de Ader (2000), a psiconeuroimunologia vem a ser a ciência que estuda as interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas e os processos imunes. Parte da premissa de que a adaptação orgânica a desafios endógenos ou exógenos seja o produto de um único e integrado sistema em que cada uma das partes evolui para executar uma função especializada. Consequentemente, a imunorregulação não pode ser entendida completamente sem que se leve em consideração o organismo como um todo e os meios externos e internos no qual as respostas comportamentais e imunes ocorrem.

O estudo comparativo dos efeitos comportamental e neurofisiológico, a neuroimunomodulação, de diferentes cepas de *T. gondii* em modelo murino ainda é escasso. O marco inicial dessa abordagem ocorreu, em 2010, com a pesquisa realizada por Khan e colaboradores, que compararam o efeito da infecção de duas cepas do tipo II (PRU e ME-49) em camundongos. Os autores observaram que embora infectados com cepas do mesmo tipo, os animais apresentaram diferenças comportamentais. As mudanças comportamentais foram proeminentes nos animais infectados pela cepa PRU, já que estes continuaram apresentando aversão ao odor do felino mesmo em uma fase mais tardia de infecção crônica. Estes animais também tiveram maior atividade locomotora e exploratória em comparação com os animais infectados pela cepa ME-49. Se por um lado estudos comportamentais, envolvendo aspectos da diversidade genética de *T. gondii* ainda são recentes e escassos, alguns trabalhos têm fornecido dados importantes sobre aspectos imunológicos, neurofisiológicos e de colonização cerebral de diferentes cepas do parasita em modelo

murino (TONIN *et al.*, 2014). No entanto, todos os trabalhos da literatura relacionados ao tema focam em cepas típicas de *T. gondii*, cepas atípicas são encontradas majoritariamente na América do Sul. Portanto, estudar a neuroimunomodulação em modelo murino, a partir de infecção com cepas atípicas de *T. gondii* isoladas de animais naturalmente contaminados no ambiente da região Norte Fluminense, é de extrema importância para se entender o papel dessas cepas atípicas no contexto dos distúrbios neurológicos em animais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita de importância médica e veterinária, causada pelo protozoário parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Este coccídio pertencente ao filo Apicomplexa, apresenta uma morfologia proliferativa circulante, um complexo apical, constituído principalmente pelas organelas micronemas e róptrias (DUBEY, 2010). Este parasito foi primeiramente descrito na Tunísia por Nicolle e Manceaux, em 1908, no cérebro de roedores selvagens, e no mesmo ano, Splendore o identificou, em coelhos no Brasil (HALONEN e WEISS, 2013).

T. gondii é um protozoário que possui um ciclo heteroxênico facultativo e intracelular obrigatório e infecta uma ampla diversidade de animais vertebrados, sendo os mamíferos e as aves seus reservatórios naturais. Todavia, somente os felídeos apresentam as formas de reprodução sexuada de *T. gondii*, e com isso, são os únicos hospedeiros definitivos (DUBEY, 2010). Na maioria dos casos, a infecção no homem causa um quadro crônico assintomático. Por outro lado, traz risco à pacientes imunocomprometidos, apresentando-se como um parasito oportunista, estabelecendo uma infecção sintomática, podendo desenvolver doenças oculares e quadros de encefalite (PETERSEN, KIJLSTRA, STANFORD, 2012; OLIVEIRA, 2016), podendo também prejudicar o desenvolvimento fetal ao ser transmitido de forma vertical pela placenta (GILBERT et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2017).

T. gondii em seu ciclo de vida, pode se apresentar em três formas biológicas infectantes: bradizoítas, taquizoítas e esporozoítas. Os bradizoítas estão presentes em cistos que se localizam em diversos tecidos dos hospedeiros. Caracterizam-se por serem de divisão lenta e predominantemente se desenvolvem na fase crônica da infecção. Os taquizoítas representam a forma circulante e de replicação rápida do parasita. São responsáveis pela disseminação do parasito no organismo do hospedeiro. Tanto bradizoítas quanto taquizoítas podem ser encontradas nos hospedeiros definitivos e intermediários. Porém os esporozoítas são encontrados no interior de oocistos liberados apenas pelos felídeos (HALONEN, WEISS, 2013).

Dentre os hospedeiros intermediários, o ser humano, pode fazer parte do ciclo de desenvolvimento da toxoplasmose, adquirindo a infecção através de três maneiras

principais: ingestão de carnes cruas ou mal cozidas contaminadas com cistos teciduais de *T. gondii*, ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente que podem contaminar aquíferos e alimentos, e pela transmissão transplacentária, na qual taquizoítas oriundos da infecção na gestante podem atingir o feto (MONTROYA, LIESENFELD, 2004). Ainda é possível adquirir a infecção pela realização de transplantes e transfusões sanguíneas (AMARAL, 2008; FOROUTAN-RAD et al., 2016).

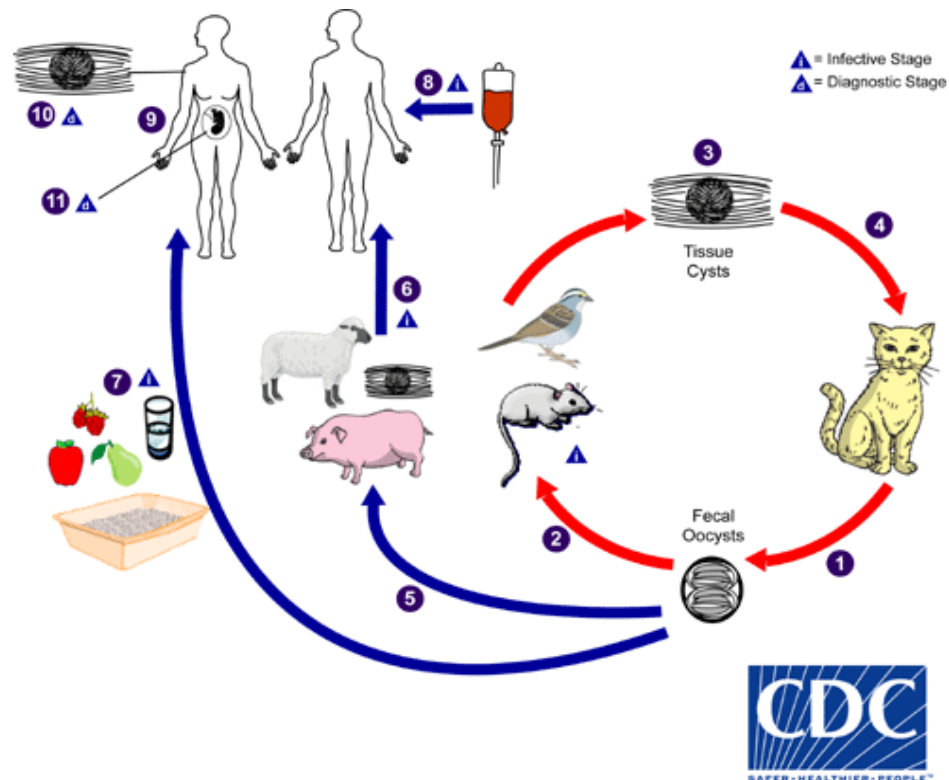


Figura 1. Ciclo do *Toxoplasma gondii*, formas infecciosas e formas de contágio.

Espécies da família Felidae se infectam pelas mesmas vias. Contudo, além do desenvolvimento parasitário pela reprodução assexuada, também ocorrem as formas sexuadas no epitélio intestinal destes animais, ocorrendo a formação de micro e macrogametócitos, fazendo-os hospedeiros definitivos do parasito. Essas formas fertilizarão e darão origem a zigotos que, formarão oocistos não esporulados posteriormente. Esses oocistos não esporulados serão liberados nas fezes dos felídeos, e serão responsáveis pela contaminação ambiental. Dentro das condições ideais de umidade e temperatura, os oocistos irão esporular, tornando-se infectantes e resistirão no ambiente por meses (HALONEN, WEISS, 2013).

2.2 Subpopulações de *T. gondii* e distribuição geográfica

Diferentes regiões geográficas possuem subpopulações de *T. gondii* distintas estruturalmente, que se formaram por recombinação sexual menos frequente, varredura populacional e biogeografia (SIBLEY et al., 2009). A maioria das cepas isoladas na América do Norte e na Europa se enquadra em uma das três linhagens clonais, referidas como tipos I, II e III (HOWE E SIBLEY, 1995). O tipo II é o mais encontrado tanto em animais quanto em humanos nessas regiões (AJZENBERG et al., 2002; FEKKAR et al., 2011; VERMA et al., 2015; VILARES et al., 2017). Mais recentemente, estudos têm sugerido que uma quarta linhagem clonal é comumente encontrada na vida selvagem na América do Norte (KHAN et al., 2011). No entanto, na América do Sul, essas três cepas clonais são isoladas esporadicamente e cepas distintas (atípicas), com uma grande diversidade genética, são mais frequentes (AJZENBERG et al., 2004). Um estudo sobre a diversidade genética de *T. gondii* em cerca de 950 isolados coletados em todo o mundo foi conduzido utilizando três métodos de genotipagem (SU et al., 2012).

A estrutura populacional de *T. gondii* na América do Norte e Europa é bem definida. As três linhagens clonais exibem baixo nível de divergência genética (apenas 1-2% de divergência a nível de sequência de DNA). Entretanto, essas linhagens clonais têm fenótipos de virulência marcadamente diferentes em camundongos, com cepas tipo I sendo letais a camundongos e cepas tipo II e III sendo consideradas menos virulentas. Diferenças em patogenicidade entre essas três cepas são amplamente determinadas por polimorfismos e expressão diferente de proteínas tais como grânulos densos e róptrias (ex. GRA15, ROP5, ROP16 e ROP18) (MELO et al., 2011). Os genótipos não pertencentes a essas três linhagens são predominantemente encontrados em outros continentes, nos quais a estrutura de populações de *T. gondii* é mais complexa, com uma alta diversidade genética (DARDE, 2008). Essas cepas possuem uma combinação misturada de alelos que tipificam as três linhagens clonais e polimorfismos únicos, indicando que elas têm mais origens ancestrais (KHAN et al., 2005). Essas cepas variam de altamente virulentas a fenótipos intermediários ou até mesmo não-virulentas em camundongos (DARDE, 2008). Entretanto, relativamente pouco é sabido sobre efeitos dessas cepas atípicas. Neste contexto, e dada à clara diferença na estrutura populacional de *T. gondii*, é importante investigar a significância desta diversidade em doenças humanas.

A virulência em camundongos está relacionada a esses tipos clonais, de maneira que cada um induz respostas diferentes no hospedeiro, resultando em patologias distintas. A linhagem do tipo I é considerada virulenta, sendo letal mesmo com baixas doses do parasito. Os tipos II e III são menos virulentas, levando ao desenvolvimento de uma infecção crônica com produção de cistos teciduais e sobrevivência dos animais (SIBLEY, MORDUE E HOWE, 1999). Em relação à virulência em humanos, em um estudo de metanálise, Xia e colaboradores (2017), encontraram associação entre o tipo III e o desenvolvimento de toxoplasmose pulmonar, além de maior risco para toxoplasmose congênitas nas infecções pelo tipo I.

Isolados de *T. gondii* encontrados na América do Sul apresentam grande diversidade genética e, com isso, são diferentes dos encontrados na América do Norte e Europa (SHWAB et al., 2014). No Brasil, esta ampla variedade genética de isolados de *T. gondii* está distribuída amplamente pelo território nacional e é proveniente de vários hospedeiros (DUBEY et al., 2012a). Em 2008, Pena e colegas observaram uma diversificada estrutura populacional, com a presença de quatro genótipos mais comuns considerados linhagens clonais brasileiras, denominados tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV, que mostraram-se, virulenta (BrI), não virulenta (BrII) e intermediárias (BrIII e BrIV), em camundongos. Porém, considerando a infecção em humanos, ao contrário do observado no hemisfério norte, a maioria das cepas atípicas, também chamadas de não arquétipos, são virulentas e a infecção leva ao desenvolvimento de quadros clínicos mesmo em pacientes imunocompetentes (ALEIXO et al., 2009; HIGA et al., 2014; SANDERS et al., 2017), e a maioria dos casos de toxoplasmose congênita estão associados à infecções por isolados atípicos virulentos (FERREIRA et al., 2011; CARNEIRO et al., 2013).

2.3 Aspectos neurofisiológicos na infecção por *Toxoplasma gondii*

Segundo Parlog e colaboradores (2015), *T. gondii* atua no SNC tanto de forma direta como indireta sobre as células nervosas. Dentre as alterações que ocorrem diretamente no SNC estão a localização dos cistos cerebrais, alteração da dopamina, silenciamento funcional de neurônios, injeção de proteínas em células não parasitadas e alterações na apoptose. Já em relação aos efeitos indiretos do toxoplasma no SNC destacam-se fatores relacionados à resposta imune.

Estudos iniciais sobre alteração comportamental em animais infectados por *T. gondii* acreditavam que a presença e a distribuição dos cistos no SNC dos animais fossem um fator primordial para o desenvolvimento de mudanças comportamentais. Algumas pesquisas observaram uma distribuição dos cistos principalmente em regiões do sistema límbico como amígdala e hipotálamo (YVAS et al., 2007a; HAROON et al., 2012). Como a amígdala é uma região do SNC relacionada ao medo, acreditava-se que alterações nessa área poderiam explicar parte das alterações comportamentais observadas nos animais infectados (YVAS et al., 2007a). Contudo, a observação de um padrão de distribuição aleatório de cistos (GULINELLO et al., 2010) e a atração ao odor do felino por animais infectados com cepa do tipo I recombinante não cistogênica foram marcos importantes para o questionamento dessa premissa (INGRAM et al., 2013).

Em um estudo de desregulação epigenética na infecção por *T. gondii* realizado por Syn e colaboradores em 2018, utilizando linhagem de células de olho humano infectadas com taquizoítos da cepa RH, tipo I não cistogênica, observaram que ocorreram mudanças na expressão do genoma do gene hospedeiro após a infecção com taquizoítos de *T. gondii*, com isso o feedback de dopamina e as vias de sinalização e processamento de amiloide foram perturbadas, levantando um argumento de que os taquizoítos assumem um papel mais inflamatório ao invés dos cistos contendo bradizoítos que periodicamente estouram e liberam bradizoítos que se transformam em taquizoítos, isto é, o taquizoíto que é o mais inflamatório ao invés do bradizoíto liberado, que medeia a patogênese da doença durante a infecção persistente. Com isso, a noção de que é necessária a formação de cistos de *T. gondii* para causar alterações em camundongos como dita por Ingram e colegas, foi desafiado usando infecção por cepa do tipo I. A proteína precursora amiloide (APP) pode ser um gene chave no desenvolvimento, porque durante a embriogênese, a sua expressão é observada nas fases iniciais do sistema nervoso e é postulado para ter papéis na migração neural (NICOLAS E HASSAN, 2014). Com a infecção por *T. gondii*, houve uma diminuição de nível de APP. Com isso, a desregulação da via amiloide durante a infecção por *T. gondii* pode ter impacto patológico na toxoplasmose adquirida congenitamente ou na fase inicial da vida (SYN et al., 2018).

T. gondii tem em seu DNA dois genes que codificam uma enzima tirosina hidroxilase homóloga a dos mamíferos (YVAS E SAPOLSKY, 2010). Essa enzima está relacionada a velocidade de síntese do neurotransmissor dopamina, e estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que células neurais infectadas pelo parasita quando estimuladas podem

secretar até três vezes mais dopamina do que células não infectadas. Em humanos, o aumento dos níveis de dopamina está relacionado ao desenvolvimento da esquizofrenia (PRANDOVSKY et al., 2011).

Atualmente, com o desenvolvimento de pesquisas sobre os efeitos neurofisiológicos da infecção pelo *T. gondii*, novas hipóteses têm surgido, para explicar as alterações comportamentais. Haroon e colegas (2012) observaram que a infecção pode resultar no silenciamento funcional dos neurônios, uma vez que células infectadas foram hipersensíveis ou não responsivas à estimulação pelo glutamato, ambos os efeitos podendo resultar na alteração do funcionamento da célula nervosa, causando perda de função. Outro possível mecanismo de atuação do parasita é a injeção de proteínas em células não parasitadas pelo mesmo. Koshy e colaboradores (2012) constataram a presença de proteínas da rópria em células neurais que não foram infectadas por *T. gondii*. No entanto, não se sabe ao certo a importância deste evento para a infecção cerebral pelo toxoplasma, mas acredita-se que tal mecanismo seja uma forma de evasão da resposta imune, já que células não parasitadas, mas com proteínas em seu interior, estariam mais propensas ao ataque da resposta imune, aumentando as chances de preservação das células realmente parasitadas.

Outra maneira de preservação de células infectadas sem a participação da resposta imune seria a alteração da apoptose (GOEBEL et al., 2001). Células neurais infectadas apresentaram inibição da clivagem das caspases 3 e 9. Já Graumann e colaboradores (2009) observaram alterações na clivagem de subunidades da caspase 8. As caspases são proteínas que estão presentes na via de ativação do processo de apoptose, portanto, alterações nessas estruturas gerariam produtos inadequados para a transmissão da sinalização da morte celular (GRAUMANN et al., 2009).

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

Após a instalação do parasita no SNC, que pode ocorrer após sete dias de infecção, há a ativação de células da glia, astrócitos e recrutamento de células T periféricas e células mononucleares (INGRAM et al., 2013). A ativação de células imunológicas leva à síntese de diversas citocinas, que podem alterar a síntese de neurotransmissores. Outra questão importante é que a infecção por *T. gondii* aumenta a síntese e liberação de óxido nítrico (NO) que tem efeito citotóxico, auxiliando na destruição das células infectadas, porém essas não são as únicas funções do NO, já que o mesmo pode ser um neurotransmissor no SNC. Em um organismo sadio os níveis de NO estão em equilíbrio, entretanto quando os níveis estão elevados ele pode ocasionar processos neurodegenerativos (TONIN et al., 2014). No que se refere a esta questão, ainda não foram observados em modelo animal os mecanismos efetivos de atuação do NO.

Outro fator apontado na literatura é a influência da resposta imune do hospedeiro sobre o aparecimento de alterações comportamentais nos indivíduos infectados (FLEGR, 2007). Koçak et al. (2012) observaram a presença de lesões (maior taxa de glicose, necrose, infiltração celular) no tecido nervoso de animais parasitados. As áreas mais afetadas foram amígdala, tálamo, lobo temporal e parietal. A partir dessa observação, levantou-se a hipótese de que, além da distribuição dos cistos, acredita-se que as lesões nas áreas afetadas também possam ter efeito no comportamento dos animais infectados.

Embora as mudanças causadas por fatores imunes, ainda, não estejam bem elucidadas, já se tem observado alterações da neuroplasticidade em animais infectados (PARLOG et al., 2015). Camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 apresentaram simplificação e redução dendrítica em células do córtex e hipocampo. Já, Mitra e colegas (2013), ao avaliarem a infecção pela cepa do tipo II (PRU) em ratos, constataram retração dendrítica na amígdala basolateral. Essa alteração na amígdala basolateral tem uma relação direta com alteração nos níveis de corticosterona, uma vez que essa estrutura possui ligações com os núcleos hipotalâmicos que iniciam a secreção desse hormônio. Os pesquisadores observaram que uma redução da matriz da amígdala basolateral apresenta redução dos níveis de corticosterona. Na literatura, a redução da corticosterona está relacionada a uma diminuição na ansiedade, corroborando com diversos trabalhos que verificaram uma redução da ansiedade em animais infectados por *T. gondii* (AFONSO et al., 2012). Todos esses mecanismos e hipóteses descritos anteriormente podem auxiliar na compreensão de como *T. gondii* pode alterar a neurofisiologia de seu hospedeiro. Entretanto, esta área de estudo ainda possui muitas lacunas no conhecimento.

3. JUSTIFICATIVA

Aproximadamente um terço da população mundial encontra-se infectada cronicamente por *T. gondii* (AJIOKA, SOLDATI, 2007). A infecção por *T. gondii* em homens e em animais é muito disseminada ao redor do globo, mas varia em diferentes áreas geográficas, que dependendo das condições ambientais podem determinar o grau de disseminação natural da infecção, podendo ser mais prevalente em climas mais quentes, de baixa altitude e úmidos, do que em climas frios, regiões de montanhas e áreas secas. Hábitos culturais e de higiene apresentam um importante fator na transmissão da toxoplasmose. A ingestão de água é muito associada à infecção por *T. gondii* no Brasil. Uma vez que *T. gondii* é resistente à inativação por cloro, uma filtração especial é necessária para tratar a água potável que pode estar contaminada com oocistos. Em estudos do nosso grupo, demonstrou-se que o *status* socioeconômico correlaciona-se com a soroprevalência de *T. gondii* em Campos dos Goytacazes, sendo o grupo socioeconômico mais alto o de menores taxas de soroprevalência. No Brasil, a prevalência de toxoplasmose atinge percentual superior a 80% em algumas regiões (DUBEY et al., 2012). Os índices de toxoplasmose congênita no país também são elevados, 20 em cada 10.000 recém-nascidos vivos, resultando em graves consequências aos fetos e recém-nascidos, inclusive podendo levar a óbitos. A soroprevalência de *T. gondii* em crianças e gestantes brasileiras é considerada uma das mais altas no mundo, com valores superiores a 70% em algumas localidades (GILBERT et al., 2008; PAPPAS et al., 2009). As doenças oculares decorrentes da infecção pelo parasito afetam até 27,3% da população (FERREIRA et al., 2014).

Estudos mostram correlação entre infecção por *T. gondii* e desenvolvimento de doenças psiquiátricas, como transtorno bipolar, esquizofrenia, possivelmente para TOC (Transtorno Obsessivo Compulsivo) e abuso de drogas (FLEGR et al., 2000; TORREY et al., 2007; YOLKEN et al., 2009), entretanto maiores pesquisas são necessárias para compreender melhor os mecanismos fisiológicos envolvidos (SUTTERLAND et al., 2015). Devido a grande dificuldade de estudar os efeitos da neurotoxoplasmose e os efeitos pelas diferentes cepas clonais e não clonais de *T. gondii*, e a distribuição não uniforme de cistos no sistema nervoso central, é de extrema importância o desenvolvimento e padronização em modelo murinho.

Estudos iniciais sobre alteração comportamental em animais infectados por *T. gondii* acreditavam que a presença e a distribuição dos cistos no SNC dos animais fossem um fator

primordial para o desenvolvimento de mudanças comportamentais. A infecção pelo parasita pode resultar no silenciamento funcional dos neurônios, após sua instalação no SNC, que pode ocorrer em sete dias de infecção, há a ativação de células da glia, astrócitos e recrutamento de células T periféricas e células mononucleares. A ativação de células imunológicas leva à síntese de diversas citocinas, que podem alterar a síntese de neurotransmissores. Outro fator apontado na literatura é a influência da resposta imune do hospedeiro sobre o aparecimento de alterações comportamentais nos indivíduos infectados (PARLOG et al., 2015).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estabelecer delineamento experimental e padronizar técnicas de avaliação de parâmetros imunofisiológicos sistêmicos e cerebrais em camundongos BALB/c infectados com cepas típicas e atípicas de *T. gondii*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver modelos de infecção experimental em camundongos BALB/c com as cepas ME-49 (tipo II), VEG (tipo III) e duas cepas atípicas de *T. gondii*;
2. Avaliar quinzenalmente indicadores de infecção tais como peso, arrepio de pelo e consumo de água dos animais ao longo do período experimental;
3. Avaliar a soroconversão dos animais infectados com as diferentes cepas de *T. gondii*;
4. Padronizar método de Griess para quantificação de óxido nítrico no sangue periférico e cérebro dos animais infectados pelas diferentes cepas de *T. gondii*;
5. Estabelecer condições ideais de uso de marcadores de superfície para identificação de células TCD4, TCD8, NK, TCD4/TCD8 de memória, TCD8a/DX5, TCD8 regulatória e controles isotípicos IgG2b/IgG2a sistêmicas e cerebrais de camundongos, por citometria de fluxo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Comissão de Ética

A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), protocolo nº 385 (Anexo 1).

5.2 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c machos, com oito semanas de idade, doados pelo Biotério da FIOCRUZ. Esses animais foram divididos em cinco grupos a saber: 1) controle, 2) infectado por cepa típica tipo III VEG de *T. gondii*, 3) infectado por cepa típica tipo II ME-49 de *T. gondii*, 4) infectado por cepa atípica Isolado #19 galinha 060 de *T. gondii* e 5) infectado por cepa atípica Isolado #21 galinha 371 de *T. gondii*. Foram utilizados 24 animais por grupo, perfazendo um total de 120 animais. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, com livre acesso a água *ad libitum* e ração, alojados em gaiolas de plástico (quatro animais/gaiola) contendo maravalha autoclavada.

Após trinta semanas de infecção, os animais foram eutanasiados por Uretano (SIGMA). Seis animais de cada grupo foram perfundidos através do coração pelo ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4% em PBS (Phosphate Buffered Saline (Salina Fosfatada Tamponada)). Os encéfalos foram removidos e fixados com formol tamponado por 24 horas, logo depois, desidratados e embebidos em parafina. Os encéfalos foram armazenados para posteriores análises imunohistológicas.

5.3 Manutenção das cepas e preparação dos inóculos

As cepas típicas cistogênicas de *T. gondii*, ME-49 (genótipo II) e VEG (genótipo III), foram mantidas através de sucessivas passagens com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos Suíços não isogênicos. Os animais cronicamente infectados foram submetidos à eutanásia por dióxido de carbono (CO₂) e os cérebros macerados e homogeneizados com 1 mL de solução salina estéril (PBS 1x) por cérebro. A quantificação dos cistos foi realizada

por microscopia ótica convencional e a suspensão final foi ajustada para um volume contendo 100 cistos/mL, para posterior utilização nos ensaios de infecção dos camundongos. As cepas atípicas cistogênicas de *T. gondii*, foram previamente selecionadas a partir das cepas armazenadas no nitrogênio líquido no LBR (Laboratório Biologia do Reconhecer), foram descongeladas rapidamente por 1 minuto em banho maria a 37°C e passadas para meio de cultura celular de fibroblastos (Meio DMEM F-12 suplementado com gentamicina e SFB (Soro Fetal Bovino)), após a constatação da viabilidade da cepa por presença de cistos através de microscopia ótica (Nikon AFX). Posteriormente estes cistos foram passados para os camundongos BALB/c.

5.4 Delineamento experimental das infecções com as cepas típicas e atípicas de *T. gondii*

Os camundongos BALB/c foram infectados por via oral (gavagem) com 15 cistos de *T. gondii*, provenientes de animais em infecção crônica com ambas as linhagens típicas de *T. gondii* (ME-49 e VEG). A mesma via de infecção, oral, foi utilizada para infecção dos camundongos BALB/c com as 2 cepas atípicas de *T. gondii*, isolado #19 e isolado #21, provenientes de animais da região Norte Fluminense infectados naturalmente no ambiente e mantidas congeladas em nitrogênio líquido no LBR. Os animais foram acompanhados por um período de vinte semanas pós-inoculação, sendo eutanasiados após a bateria de testes comportamentais, permitindo a comparação dos parâmetros entre controle, cepas típicas e atípicas.

5.5 Avaliação da soroconversão por detecção de IgG anti-*T. gondii* no soro dos camundongos

5.5.1 Lisado proteico de *T. gondii* a partir de cepa RH

Para o preparo do lisado proteico, 60 camundongos BALB/c de ambos os sexos foram infectados com taquizoítas de *T. gondii*, cepa RH. Os camundongos foram eutanasiados na câmara de CO₂ e presos à placa de cortiça em decúbito dorsal com auxílio de agulhas. Após exposição do peritônio, foram injetados 5 mL de PBS (1x) gelado. O peritônio foi massageado e o líquido peritoneal contendo os taquizoítas foi recolhido através

de punção com seringa. Para a manutenção da cepa, foram inoculados intraperitonealmente 0,4 - 0,6 mL por camundongo, de material coletado do lavado peritoneal. Para o preparo do lisado proteico, após realização dos lavados peritoneais, o conteúdo das seringas foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugado a 100 x g por cinco minutos a 4 °C para retirada de células peritoneais. O sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 913 x g por trinta minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 2 mL de PBS 1x p.H. 7,2 e ajustou-se o volume final para 40 mL com PBS (1x). Uma alíquota dos taquizoítas ressuspendidos nos 40 mL de PBS foi diluído na proporção 1:100 e, contou-se o número de taquizoítas em câmara de Neubauer. A suspensão de taquizoítas foi centrifugada a 913 x g por 20 minutos a 4 °C e descartou-se o sobrenadante. Calculou-se a quantidade de taquizoítas na suspensão e determinou-se o volume de água destilada a ser ressuspendido para recuperar $2,5 \times 10^8$ parasitas/mL. Sonicou-se seis vezes no modo baixo por trinta segundos cada vez. Terminado os seis pulsos, a preparação foi centrifugada a 900 x g por 20 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi aliquotado em tubos em tubos de 1,5 mL, e centrifugados na microcentrífuga a aproximadamente 10.000 x g por dez minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos de 1,5 mL e submeteu-se a dosagem de proteínas.

O lisado proteico de *T. gondii* a partir de cepa RH, produzido com o lavado peritoneal de 60 camundongos, após dosagem de proteínas pelo método de Lowry, obteve concentração final de 1.416 µg/ mL.

5.5.2 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA)

A resposta imune humoral dos animais foi avaliada para observar soroconversão através da detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* através de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) utilizando o anticorpo α -mouse IgG (Fc) #A2554 (SIGMA). A placa de ELISA foi sensibilizada *overnight* com o lisado proteico de *T. gondii* preparado a partir de cepa RH e descrito no item acima. Após o período de sensibilização, a placa foi lavada três vezes com PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween 20 (Salina Fosfatada Tamponada com Tween 20)) 0,05% e descartado por inversão. Em seguida, os soros dos camundongos, diluídos 1:64 em solução diluente PBST 0,05% + BSA (Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)) 0,5%, foram adicionados à placa em duplicata e incubados à 37° C por uma hora. A placa foi novamente lavada por três vezes com a mesma solução, e então, o anticorpo secundário foi adicionado e incubado por mais uma hora a 37°

C. Então, a placa foi lavada por mais três vezes e a solução de revelação ABTS (ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) foi adicionada e mantida ao abrigo da luz até a leitura. Imediatamente após o aparecimento da cor, a reação foi lida no leitor de placas Epoch (BioTek).

5.5.3 Padronização da Marcação Fenotípica de Células Sistêmicas e Cerebrais de Camundongos

Para o preparo do macerado cerebral, os camundongos foram pesados e eutanasiados com Uretano (SIGMA). O encéfalo foi coletado, pesado, cortado em cubos e depois transferido para um tubo contendo 2 mL de meio DMEM F-12 (Dubelcco's Modified Essential Medium (Meio essencial modificado Dubelcco's)) livre de Mg^{2+}/Ca^{2+} , suplementado com HEPES ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 10 mM p.H. 7,6, EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)), tripsina 0,5 mM, 0,001% de DNase I por 20 minutos a 37°C. Logo após foram adicionados 6 mL de meio DMEM F-12 suplementado com soro fetal bovino 5% , e centrifugado por 7 minutos a 100 x g. O sobrenadante foi removido e o sedimento triturado em 1 mL de meio DMEM F-12, produzindo uma suspensão de células únicas que foi subsequentemente passada através de um filtro células de 70 μm para remover detritos (RIETZE et al., 2001). Para a imuno marcação os anticorpos foram diluídos em PBS/ BSA 2% em tubo de 1,5 mL, depois a amostra foi adicionada ao tubo e incubada por 30 minutos na geladeira e, posteriormente, lavada duas vezes com PBS/SFB 10% a 300 x g por 5 minutos. Foi adicionado 300 μL da solução de fixação, paraformaldeído 0,5%, e realizado a leitura no Citometro de Fluxo FacsCalibur.

Amostras de sangue total também foram colhidas com EDTA por punção cardíaca. Para a imuno marcação os anticorpos foram diluídos em PBS/ BSA 2% em tubo de 1,5 mL, depois a amostra foi adicionada ao tubo e incubada por 30 minutos na geladeira. Logo em seguida foi adicionado tampão de lise de hemácias ao tubo, e deixado em repouso na temperatura ambiente por quatro minutos, e posteriormente, a amostra foi lavada duas vezes com PBS/SFB 10% a 300 x g por 5 minutos. Foi adicionado 300 μL da solução de fixação, paraformaldeído 0,5%, e realizar a leitura.

As leituras e análises foram realizadas no citometro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson) com uso do *software CellQuest*.

Tabela 1: Anticorpos usados na imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Anticorpos	Fluorocromos	Subpopulação celular	Fabricante
Anti-CD3	FITC		BD
Anti-CD4	PE/PerCP	TCD4	BD
Anti-CD8a	FITC	NK	BD
Anti-DX5	PE		BD
Anti-CD45RB	PE	TCD4/TCD8	BD
Anti-CD4/CD8	FITC/FITC	memória	BD
Anti-CD25	FITC		BD
Anti-CD8	PE	TCD8 regulatórias	BD
IgG2b	FITC		BD
IgG2a	PE	Controle isotópico	BD

5.5.4 Padronização do Método de Griess para Dosagem de Óxido Nítrico Sistêmico e Cerebral de Camundongos

Níveis de óxido nítrico (NO) de animais infectados com *T. gondii* e controles foram determinados indiretamente por quantificação de NO no soro (TATSCH et al., 2011) e no encéfalo. Os animais foram eutanasiados com Uretano (SIGMA), e tiveram sangue e encéfalo coletados. O sangue foi coletado em tudo de 1,5 mL sem anticoagulante, centrifugado e o soro transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Para a desproteinização da amostra, utilizou-se uma solução de metanol e éter (3:1, v/v), adicionada em quantidades iguais ao volume de soro sanguíneo (GUEVARA et al., 1998). A solução foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e logo após esse período foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante obtido deste procedimento foi armazenado em

tubos à temperatura de 4°C para a análise. O encéfalo coletado foi armazenado em um tubo falcon de 50 mL contendo 1 mL de meio DMEM F-12. O tecido foi cortado com tesoura e dispersado com movimentos repetidos utilizando seringa e agulha de calibre 25x0,70mm, e centrifugado a 500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubo de 1,5 mL a 4 °C.

O NO foi medido pelo método de Griess. O ensaio foi realizado em uma placa para microtitulação de 96 poços fundo cônico. A solução de Griess é composta de solução A (2,5 ml ácido fosfórico (H_3PO_4) + 0,5g de sulfanilamida + 47 ml H_2O destilada) e solução B (0,05 g N-1-naftilenodiamina + 50 ml de H_2O destilada), tendo sido utilizada na proporção 1:1 para montar a solução. A solução de Griess foi preparada utilizando-se 7 ml da solução A e 7 ml da solução B. Posteriormente foi realizada uma curva padrão em duplicata, utilizando diluições seriadas de Nitrito de Sódio ($NaNO_2$) em meio de cultura DMEM-F12. Volume equivalente a 100 µl de soro e de sobrenadante de cérebro de cada amostra foi adicionado à placa de microtitulação em duplicata. Após a realização da curva, 100 µl das amostras foram plaqueadas e então adicionados 100 µl da solução de Griess (A+B) em todos os poços. A leitura foi feita no leitor de placa Epoch (BioTek) a 570 nm.

5.5.5 Coleta de sangue periférico

Para obtenção de sangue periférico para avaliação de soroconversão e realização da dosagem de NO pelo método de Griess, foi realizada coleta de sangue pelo plexo retro orbital. Para isso, os camundongos foram contidos, e seus olhos anestesiados com colírio anestésico Anestalcon® (Cloridrato de proximetacaína 5 mg/mL) e o sangue coletado com pipeta Pasteur e armazenado em tubo de 1,5 mL.

A



B

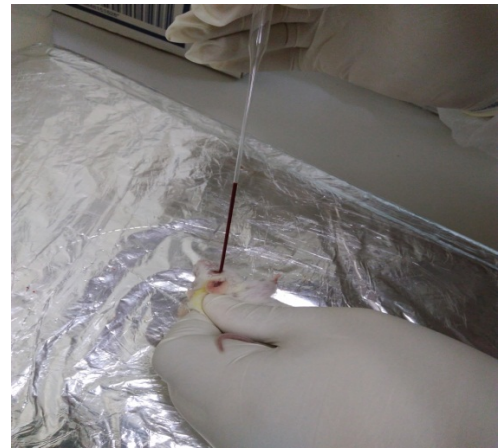


Figura 2. A- Anestesia com colírio anestésico Anestalcon® (Alcon), para coleta de sangue periférico. B- Coleta de sangue periférico pelo plexo reto orbital. (Imagens: acervo pessoal).

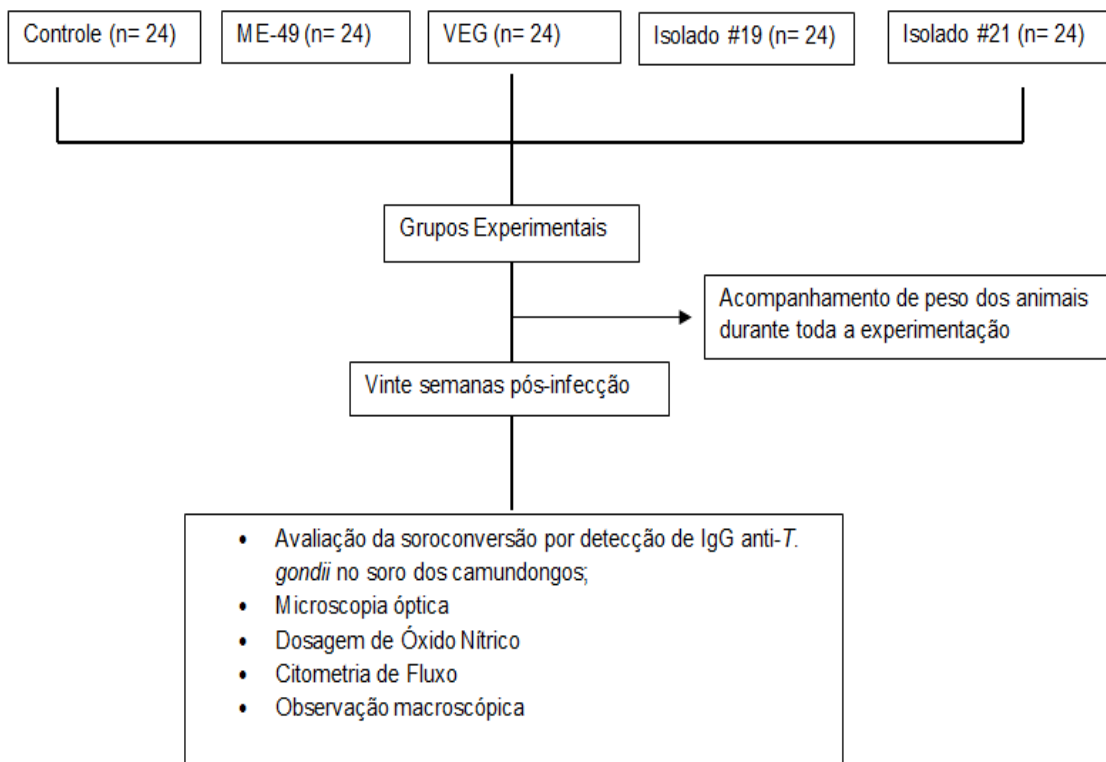
5.2 Análises estatísticas

Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para comparação entre grupos, seguido de teste de Dunn's para múltiplas comparações. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney. Foram consideradas diferenças significantes valores iguais ou menores que 0,05 ($p \leq 0,05$). Toda análise foi realizada utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 5.0.

6. RESULTADOS

6.1 Delineamento experimental

O número total de camundongos (120 animais) foi obtido após a determinação do número de animais por caixa e por grupo de forma que cada grupo tivesse vinte e quatro animais, distribuídos em seis caixas, contendo quatro animais por caixa. Este número final de 120 camundongos foi estabelecido pensando na longa duração do experimento e na necessidade de obter animais vivos no final da pesquisa para a análise estatística. Quanto ao número de camundongos por caixa, foi determinado o n=4 pensando, no conforto e hierarquia animal (comunicação pessoal com Adolpho Marlon Antoniol de Moura – Tecnologista em saúde pública). Os camundongos foram acompanhados por todo o experimento com pesagens programadas.



6.1.1 Avaliação da soroconversão por detecção de IgG anti-*T. gondii* no soro dos camundongos

Após vinte semanas de infecção, foi realizada a avaliação do soro dos camundongos quanto a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Podemos observar na Fig.2 que apenas os camundongos infectados com a cepa típica ME-49 apresentaram aumento significativo nos níveis de IgG anti-*T. gondii* comparado aos animais do grupo controle.

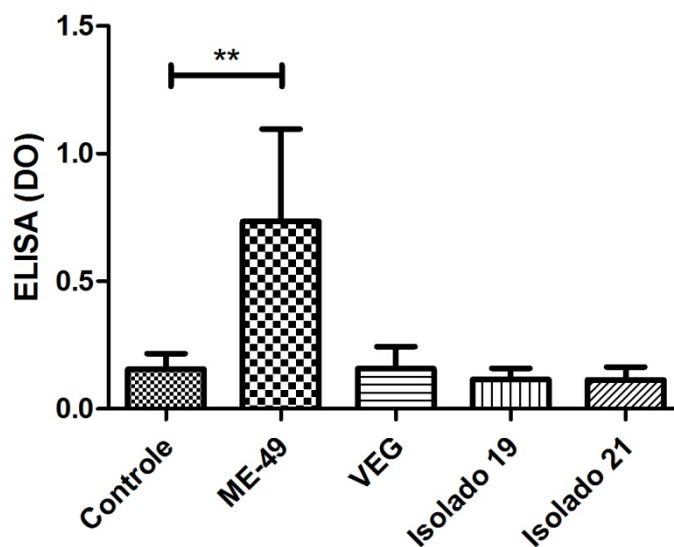


Figura 3. Detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii* no soro dos camundongos. Dados expressos com média \pm SEM ($p < 0,05$).

6.1.2 Avaliação de cistos cerebrais

Apesar da observação de soroconversão através do teste ELISA, ter sido positivo unicamente para a cepa típica ME-49, como mostrado na Fig. 2, a análise por microscopia ótica convencional do macerado cerebral de camundongos infectados pelas diferentes cepas de *T. gondii*, permitiu a visualização de cistos teciduais em amostra proveniente de animal infectado com ME-49 (**Figura 3A**), assim como em amostra de camundongo infectado pelo Isolado #19 (**Figura 3B**) e Isolado #21 (**Figura 3C**).

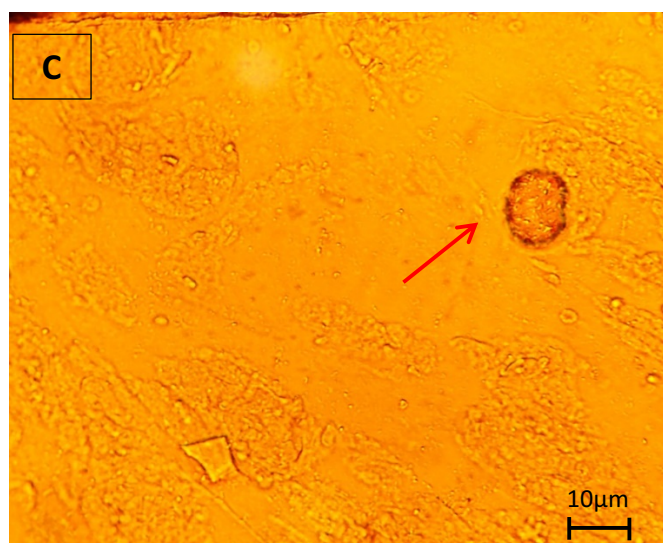
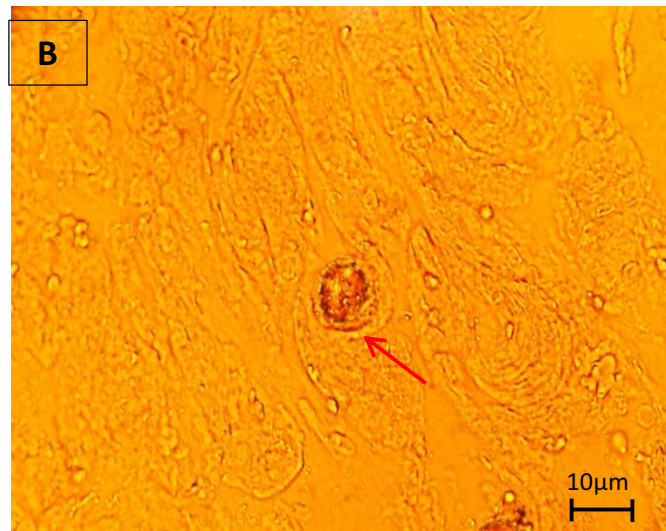
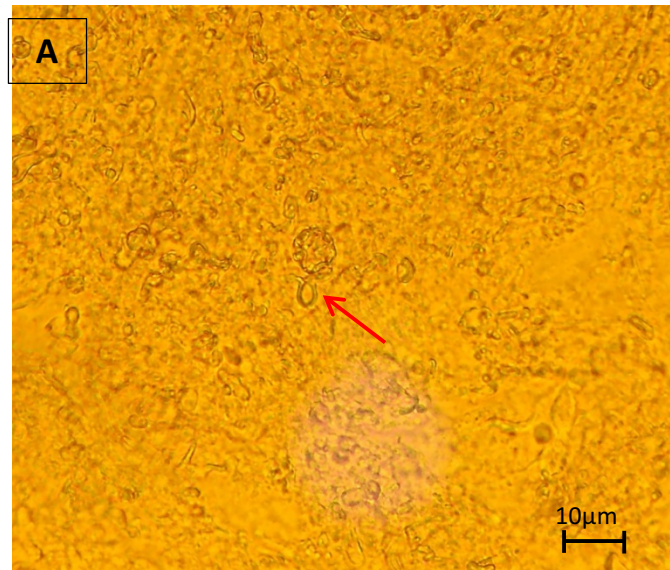


Figura 4. Cisto de *Toxoplasma gondii* em macerado cerebral de camundongo infectado pela (A) cepa ME-49, (B) Isolado #19 e (C) Isolado #21. Detectado por Microscopia óptica com aumento de 40x.

6.1.3- Avaliação dos sinais clínicos

Durante o experimento foram observados sinais clínicos, tais como peso, pelo arrepiado e olhos serrilhados nos grupos experimentais.

Os animais foram acompanhados durante todo o experimento, desde 04/04/2019 a 22/08/2019, e pesados quinzenalmente (**Figura 4**). Durante esse tempo os animais apresentaram pouca variação no peso, porém houve diferença estatística quando consideramos as médias de peso dos grupos ME-49 e Isolado #19 ($p = 0,0042$) e ME-49 e Isolado #21 ($p=0,0002$), indicando diminuição do peso dentre os animais infectados por ME-49 (**Figura 4**).

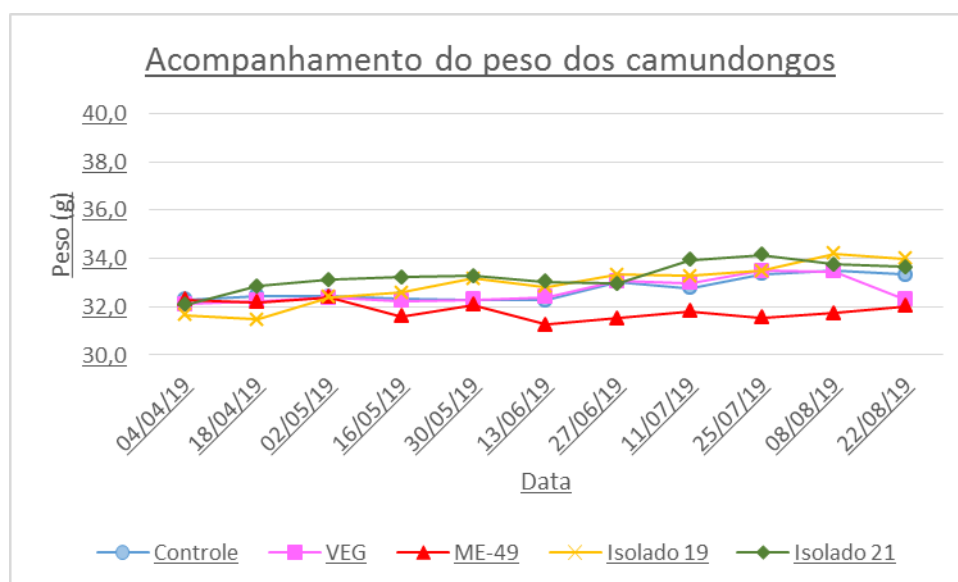


Figura 5. Acompanhamento do peso dos camundongos infectados por diferentes cepas típicas e atípicas de *T. gondii*.

Passado as 20 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e avaliados quanto ao peso, tanto o peso corporal, quanto o tecido cerebral (**Figura 5**). Na comparação entre o peso dos cérebros dos grupos experimentais, controle e infectados, não foi encontrada diferença estatística.

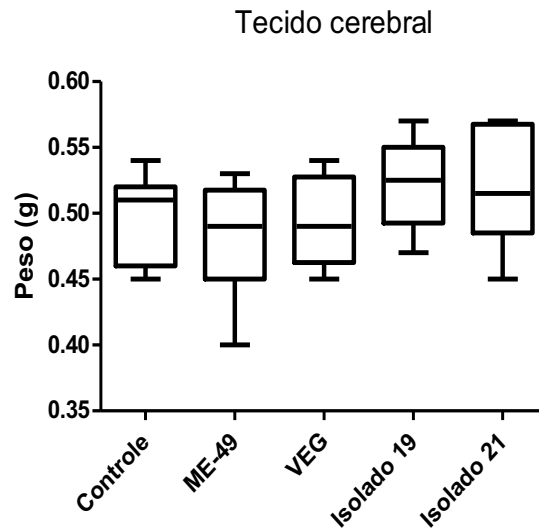


Figura 6. Peso dos tecidos cerebrais dos camundongos, nos diferentes grupos experimentais.

Quando avaliados quanto a pelagem, os animais infectados apresentaram aparência diferenciada do grupo controle, apresentando pelos arrepiados, característico da infecção por *T. gondii* (**Figura 6**).

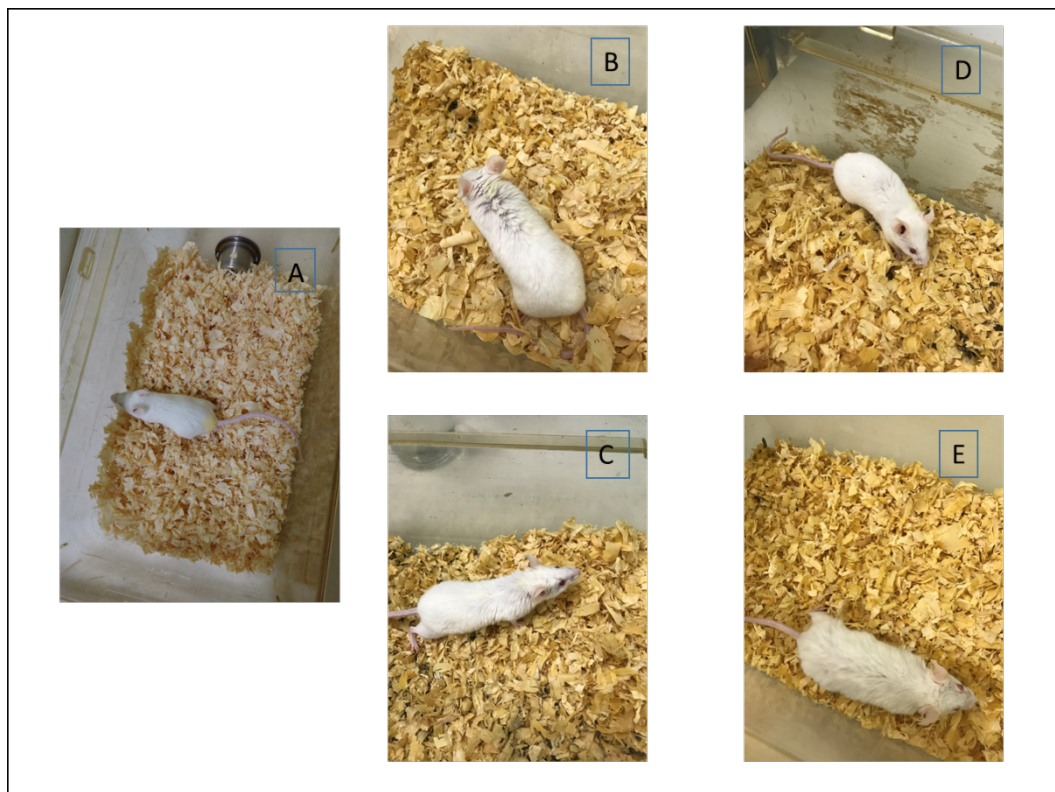


Figura 7. Observação da pelagem dos animais dos diferentes grupos experimentais. A: Camundongo Controle. B: Camundongo infectado pela cepa típica VEG. C: Camundongo infectado pela cepa típica ME-49. D: Camundongo infectado pelo Isolado #19. E: Camundongo infectado pelo Isolado #21.

Também foi observado que os animais infectados, tanto pelas cepas típicas, quanto pelas cepas atípicas, ingeriram mais água quando comparados ao grupo controle. Esse dado é apenas observacional.

6.1.4 Dosagem de Óxido Nítrico

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada pelo método de Griess, utilizando soro (desproteínizado) e sobrenadante de macerado cerebral. Na figura 8 é demonstrada a concentração de NO (mg/mL) em ambos tipos de amostras. Não houve produção de NO nas amostras de soro em níveis detectáveis (**Figura 7.B**), sendo possível observar concentrações negativas nos grupos, provavelmente por apresentar absorvância negativa e interferir na equação da reta para determinação dos valores. A análise estatística realizada não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p=0,6931$). É possível observar uma produção basal de NO no cérebro (**Figura 7.B**), no entanto nenhuma produção significativa foi observada quando comparado os grupos infectados ao controle ($p=0,1493$). Podemos observar dois indivíduos produzindo concentrações mais elevadas de NO no grupo Isolado #21, porém a média se manteve e o intervalo de confiança sobrepõe aos demais grupos.

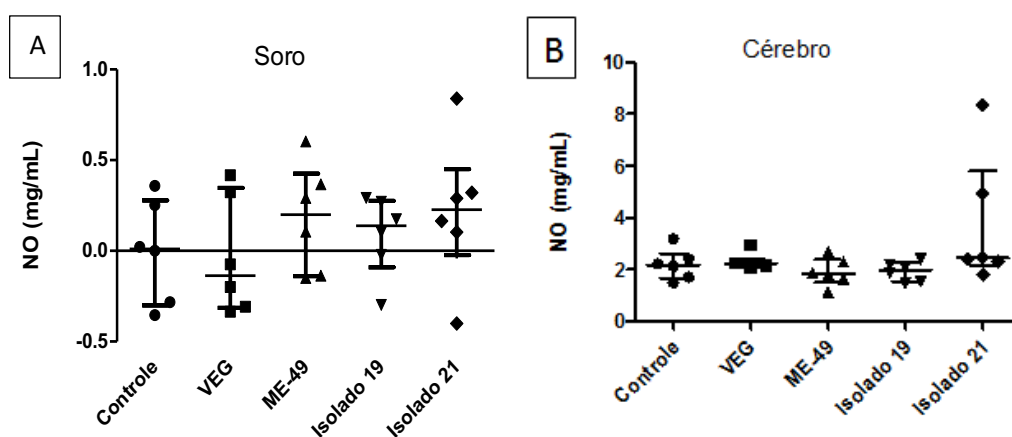


Figura 8. Dosagem de NO nos grupos experimentais. A: Dosagem de NO no soro desproteínizado dos grupos experimentais. B: Dosagem de NO no macerado cerebral. Teste Kruskal Wallis seguido de teste de Dun's para múltiplas comparações.

6.1.5 Citometria de Fluxo

Na realização da padronização da citometria de fluxo foram utilizadas as seguintes marcações com sangue total e macerado cerebral: CD3 (FITC) x CD4 (PerCP), CD25 (FITC)

x CD8 (PE), CD4 (FITC) x CD45RB (PE), CD8 (FITC) x CD45RB (PE), CD8 (FITC) x DX5 (PE). Também foram realizadas as marcações para CD3 (FITC) x CD4 (PE) e CD25 (FITC) x CD8 (PE), porém não obtivemos leitura no citômetro de fluxo (resultados não mostrados).

Nas padronizações para o uso da técnica de citometria de fluxo com sangue e encéfalo de camundongos, obtivemos leitura com os seguintes materiais biológicos e anticorpos:

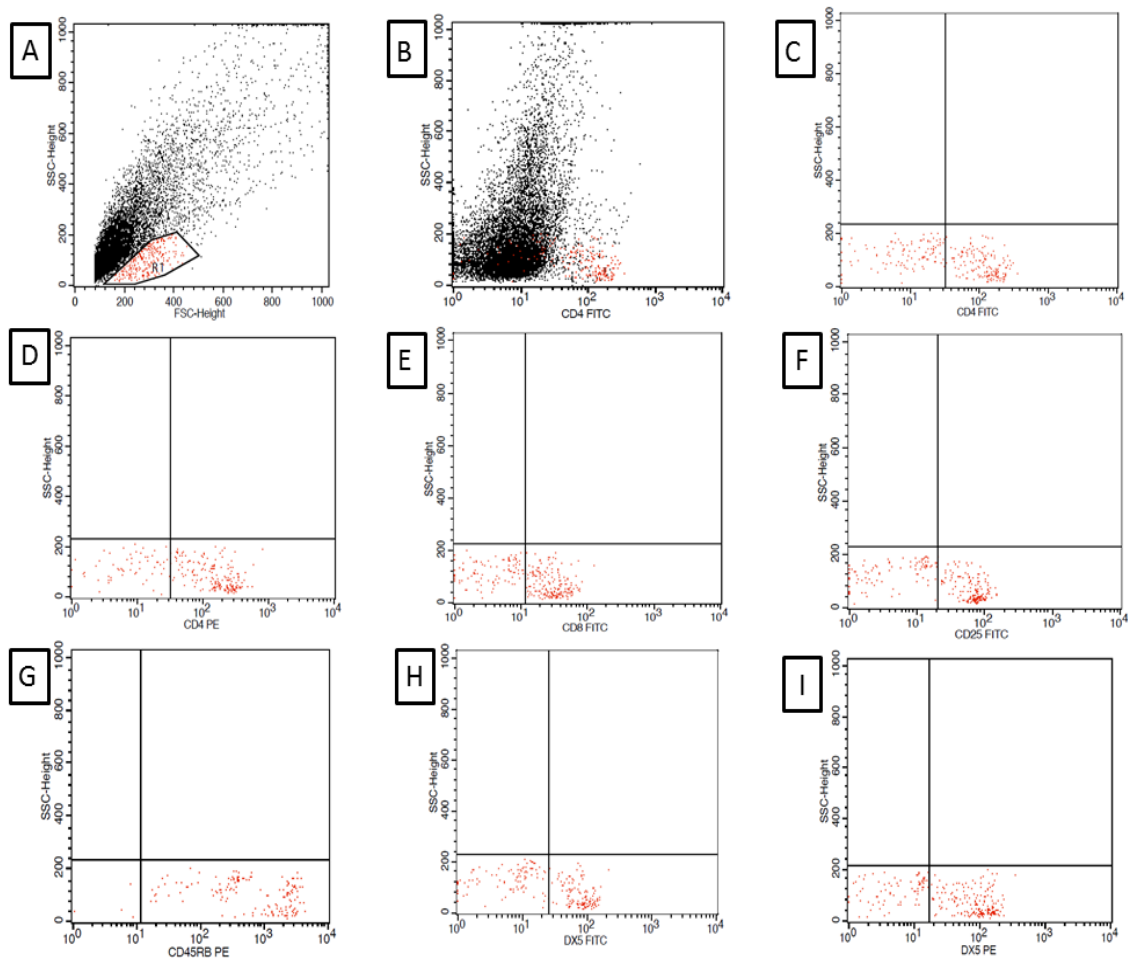


Figura 9- Representação por dotplot de setagem celular por citometria de fluxo. A- Gráfico de parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulidade (SSC - *Side Scatter*) destacando-se a area circundada (gate) que representa os linfócitos; 30µl de macerado cerebral foram utilizados para marcação com os anticorpos monoclonais específicos para cada subpopulação de célula, foram utilizados 5µl dos anticorpos nos testes, exceto pelo gráfico F, o qual utilizamos 10µl; os gráficos representam marcações positivas para cada subpopulação de células. B e C- Linfócitos T CD4, com anticorpo anti-mouse CD4 (FITC); D- Linfócitos T CD4, com anticorpo anti-mouse CD4 (PE); E- Linfócitos T CD8, com anticorpo anti-mouse CD8a (FITC); F- Linfócitos T CD25, com anticorpo anti-mouse CD25 (FITC); G- Três populações positivas para leucócitos, utilizando anticorpo anti-mouse CD45RB (PE); H- Células NK, com anticorpo anti-mouse DX5 (FITC); I- Células NK, com anticorpo anti-mouse DX5 (PE).

A partir desses resultados, padronizamos a quantidade de anticorpo e de tecidos, sangue e macerado cerebral, a serem utilizadas nos experimentos seguintes.

Um encéfalo de camundongo infectado com a cepa ME-49 foi processado para Citometria, no gráfico de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC - *Forward Scatter*), ao observar dispersão, não conseguimos identificar a localização dos linfócitos. Então, nas células marcadas com anti-CD4, para marcar linfócitos T CD4, quando observado o gráfico granulosidade (SSC) x CD4 (FITC), observamos uma pequena população mais deslocada para a direita, sendo provavelmente os linfócitos, com isso marcamos essas células com o que chamamos de *gate* reverso. A partir da localização de CD4, pudemos localizar a população de linfócitos na base de dispersão das células do macerado cerebral, ficando um pouco mais a direita e bem abaixo, com relação a granulosidade, uma vez que os linfócitos são pouco granuloso. Assim pudemos diferenciar e localizar essa região de linfócitos para as

marcações

seguintes.

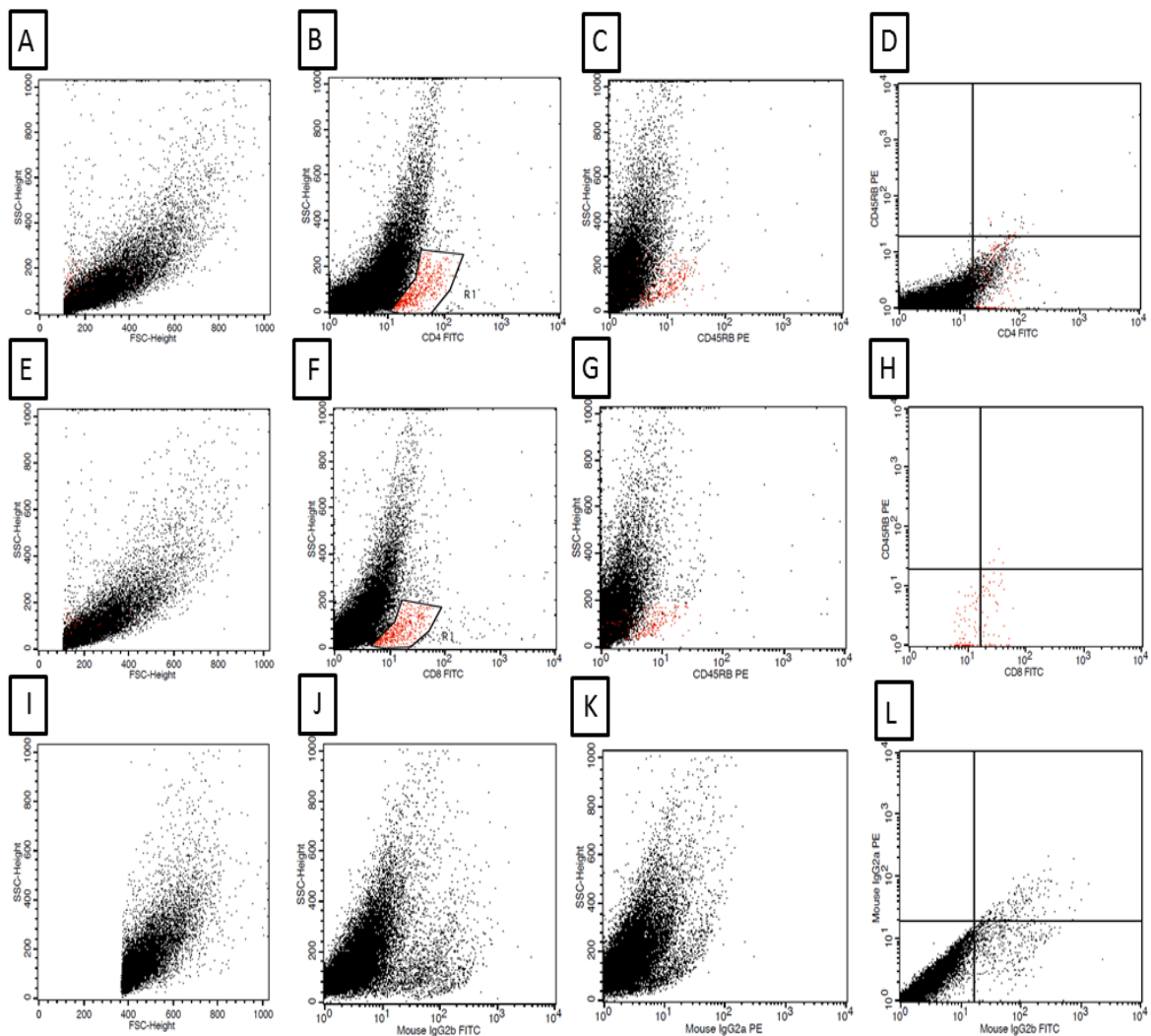


Figura 10: Representação por dotplot de setagem celular por citometria de fluxo. Cérebro cepa ME-49. **A, E e I** - Gráfico de parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC - *Side Scatter*); **B e F** - Tentativas de localização da população linfocitária por *gate* reverso na marcação de CD4 e CD8 respectivamente, que marca principalmente linfócitos T, mas também marca monócitos, utilizando 20 µl de macerado cerebral e 5µl de anticorpo FITC anti-mouse CD4 e 10µl de anticorpo FITC anti-mouse CD8 ; **C e G** - Representação de marcação anti- CD45RB nos linfócitos , utilizando 20 µl de macerado cerebral e 5µl de anticorpo PE anti-mouse CD45RB; **D**- Representação de uma marcação dupla positiva para linfócitos T CD4 e CD45RB, destacando-se o quadrado superior a direita com células duplamente positivas para os marcadores utilizados (Anti-CD4 e Anti-CD45RB); **H** - Representação de uma marcação dupla positiva para linfócitos T CD8 e CD45RB, destacando-se o quadrado superior a direita com células duplamente positivas para os marcadores utilizados (Anti-CD8 e Anti-CD45RB); **J e K**- Tentativa de localização da população linfocítica por *gate* reverso na marcação de controle isotípico FITC mouse IgG_{2b} e controle isotípico PE mouse IgG_{2a}, respectivamente, apresentam marcações inespecíficas; **L**- Representação de marcações inespecíficas pelos controles isotípicos FITC mouse IgG_{2b} e PE mouse IgG_{2a}.

Na marcação utilizando sangue total de camundongo infectado com Isolado #21, os anticorpos anti-CD3 (FITC) e anti-CD4 (PerCP) apresentaram baixa intensidade de fluorescência, já a marcação anti-CD8 (FITC) e anti-DX5 (PE) obteve uma boa fluorescência, apresentando células marcadas.

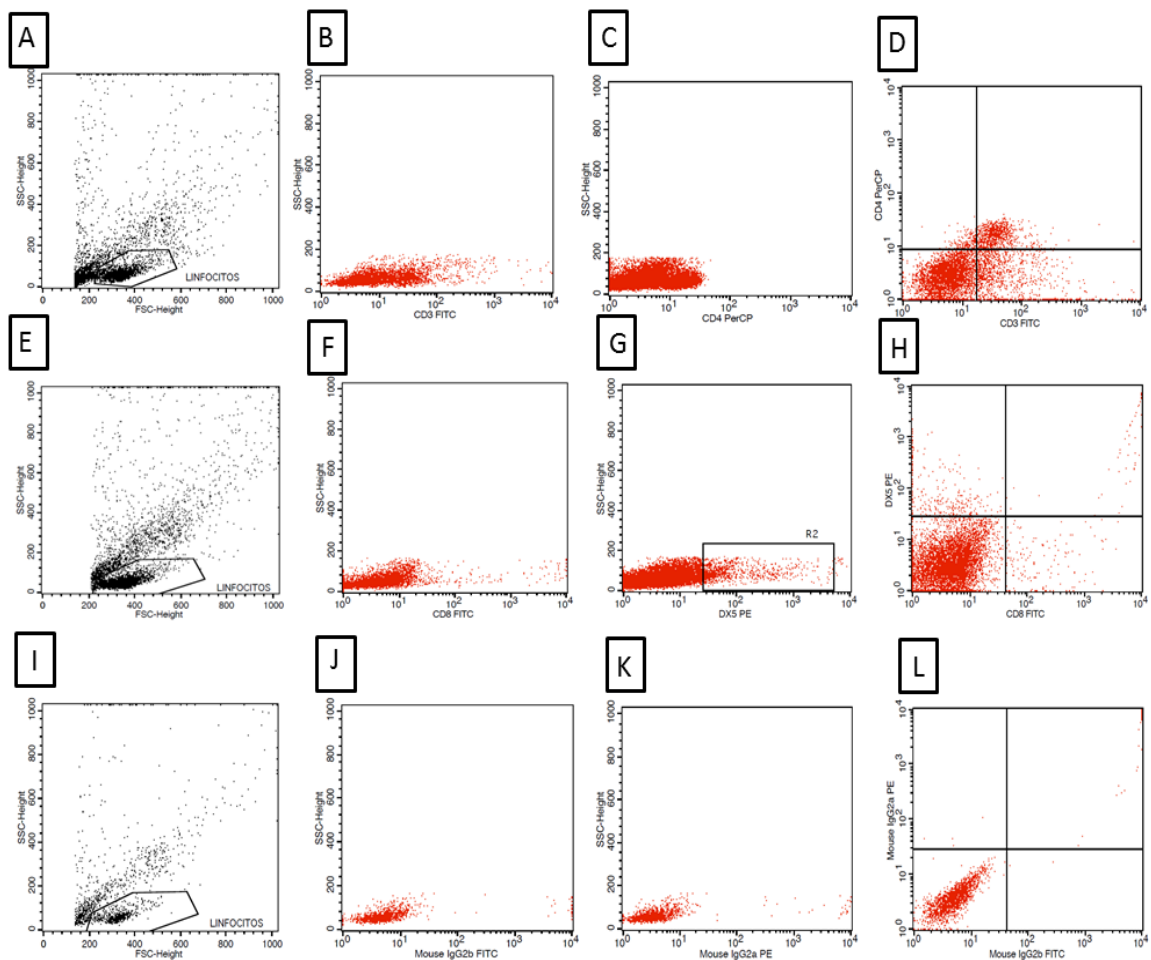


Figura 11: Representação por dotplot de setagem celular por citometria de fluxo. Sangue cepa Isolado #21. A, E e I - Gráfico de parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC - *Side Scatter*); foram utilizados 20ml de sangue total dos camundongos. **B e C** - Localização da população linfocitária na marcação com 5 μ l de anti-mouse CD3 (FITC), marcador de linfócitos T e 5 μ l de anti-mouse CD4 (PerCP), marcador de linfócito CD4⁺ respectivamente; **D**- Marcação dupla positiva para linfócitos T CD4⁺ com os anticorpos dos gráficos **B** e **C**, destacando-se o quadrado superior a direita com células duplamente positivas para os marcadores utilizados. **F e G** - Localização de população linfocitárias com marcação de 5 μ l anti-mouse CD8 (FITC) e 5 μ l de anti-mouse DX5 (PE), marcando principalmente linfócitos T e NK respectivamente; **H** - Marcação dupla positiva para linfócitos NK CD8⁺ com os anticorpos dos gráficos **F** e **G**, destacando-se o quadrado superior a direita com células duplamente positivas para os marcadores utilizados; **J e K**- Localização da população linfocítica na marcação de controle isotípico mouse IgG_{2b} (FITC) e mouse IgG_{2a} (PE); **L**- Marcação dupla positiva para os controles isotípicos IgG_{2b} e IgG_{2a} com os anticorpos dos gráficos **J** e **K**, destacando-se o quadrado superior a direita com células duplamente positivas para os marcadores utilizados.

6.1.6 Observação macroscópica

Apesar da negatividade no teste de ELISA para produção de anticorpos anti-*T. gondii* em relação aos animais infectados com os isolados #19 e #21, durante a necropsia foi observada a formação de uma camada de inflamação no músculo cardíaco dos camundongos infectados pelas cepas atípicas, isolado #19 (**Figura 13**) e Isolado #21 (**Figura 14**). Tal característica não foi observada no músculo cardíaco dos camundongos do grupo controle (**Figura 11**) e infectado pela cepa típica ME-49 (**Figura 12**). Estes materiais estão preservados no RNA *later* a – 20 °C para análises futuras.



Figura 12. Fotografia de tórax e abdômen de camundongo do grupo controle. Seta indicando o coração com características normais. (Imagem: acervo pessoal)



Figura 13. Fotografia de tórax e abdômen de camundongo do grupo ME-49. Seta indicando o coração com características normais. (Imagem: acervo pessoal)



Figura 14. Fotografia de tórax e abdômen de camundongo do grupo Isolado #19. Seta indicando o coração com presença de biofilme. (Imagem: acervo pessoal)

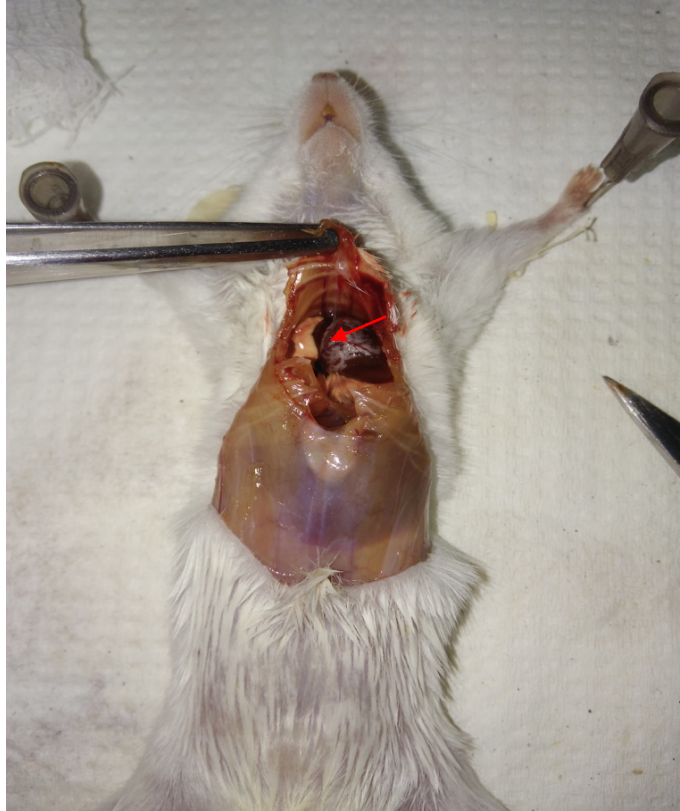


Figura 15. Fotografia de tórax e abdômen de camundongo do grupo Isolado #21. Seta indicando o coração com presença de biofilme. (Imagem: acervo pessoal)

7 DISCUSSÃO

Toxoplasma gondii é um parasita de grande sucesso, capaz de atravessar a maioria das barreiras biológicas do corpo (BARRAGAN, 2002; HARKER et al., 2015). O parasita pode infectar células imunes migratórias, como células dendríticas (DCs), macrófagos e granulócitos neutrófilos, para entrar em sítios imunoprivilegiados (BARRAGAN, 2002; DA GAMA et al., 2004; COURRET et al., 2006; LAMBERT et al., 2006). Vários estudos propõem que a infecção pelo *T. gondii* pode provocar mudanças metabólicas, imunológicas e neuropatológicas, possibilitando alterações no comportamento de hospedeiros intermediários, tais como os roedores (VYAS E SAPOLSKY, 2010).

Neste trabalho nos propomos a estabelecer um modelo experimental murino que nos possibilitasse comparar o efeito da infecção por diferentes cepas típicas e atípicas cistogênicas de *T. gondii* sobre o comportamento dos animais, comparado à um grupo controle não infectado. Inicialmente, o sucesso das infecções com cistos teciduais de *T. gondii* foi observado por meio do teste de ELISA. Somente a cepa ME-49 apresentou sorologia positiva para *T. gondii*. No entanto, apesar da sorologia negativa apresentada no ELISA dos camundongos infectados com as cepas atípicas, foram encontrados cistos teciduais nos macerados cerebrais dos camundongos infectados com os isolados #19 e #21, assim como também no macerado cerebral da cepa ME-49. Os cistos cerebrais contendo bradizoítas, foram visualizados por microscopia ótica convencional, mostrando que os camundongos estão infectados cronicamente pelas respectivas cepas. O fato de terem sido observadas estruturas morfológicamente compatíveis com cistos de *T. gondii* nos macerados cerebrais dos animais infectados com cepas atípicas durante a fase crônica, sugere que estes isolados apresentam característica neurotrópica, comum a este parasito (DUBEY et al., 2005). A obtenção desses isolados foi a partir de bioensaio, onde tecidos de galinhas naturalmente infectadas por *T. gondii* foram macerados e inoculados diretamente em camundongos. Este método comumente utilizado para isolamento de *T. gondii*, não permite determinar a virulência da cepa obtida, pois a quantidade de cistos inoculados e a de bradizoítas presentes nos cistos teciduais das amostras a serem analisadas não são conhecidas (DUBEY et al., 2012b). Outra possível explicação para a não detecção da soroconversão dos animais infectados com as cepas atípicas e que apresentaram cistos teciduais no macerado dos cérebros é que o teste de ELISA convencional não seja capaz de detectar anticorpos produzidos contra epítomos específicos dessas cepas, por uso de antígeno

produzido a partir de uma cepa clonal tipo I (RH), embora exista uma grande similaridade genética (mais de 98%) entre as linhagens de *T. gondii* (KHAN et al, 2011). Nossos dados corroboram com achados da literatura, onde Martins e colaboradores (2015) também observaram que indivíduos com sorologia negativa para a infecção por *T. gondii* pelo teste de ELISA convencional, apresentaram detecção de marcadores do parasita pelo método Sequenciamento de SANGER em amostras de DNA extraído de sangue periférico desses pacientes.

Outros sintomas avaliados durante o acompanhamento dos animais em experimentação foi peso, característica do pelo e consumo de água. Observamos que devido ao longo tempo do experimento, os animais ganharam peso, porém só demonstraram significância estatística quando comparado ME-49 com Isolado #19 e ME-49 com Isolado #21. Com o desenvolvimento da infecção, os camundongos começaram a apresentar sinais clínicos como pelos arrepiados e olhos serrilhados, sendo característico da fase aguda da doença da infecção. No entanto, esses sinais continuaram sendo observados na fase crônica, assim como relatado também por Oliveira e colaboradores (2014). Além disso, houve a elevação no consumo de água observada nos grupos infectados comparados ao grupo controle. Acredita-se que durante processos patológicos o comportamento de alguns animais pode ser alterado, sendo comum o aumento da letargia, diminuição da atividade locomotora e consumo de água e alimento. Esses e outros fatores podem contribuir para a diminuição do gasto energético e exposição do animal a riscos em um período de maior vulnerabilidade (ALVES E PALERMO-NETO, 2007).

Outro parâmetro utilizado em doenças infecciosas é a produção de Óxido Nítrico, pois está envolvido em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos (KEKLIKOGU et al., 2008). NO é um produto da enzima NOS, que catalisa a conversão de arginina e oxigênio em NO e citrulina. Nossos resultados em relação à NO demonstraram níveis basais em amostras de macerado cerebral e diferentes concentrações dos grupos experimentais para amostras de soro. Em níveis fisiológicos, o NO tem efeito protetor no SNC, assim como em outros tecidos (CALABRESE et al., 2007). Acima dos níveis fisiológicos, o NO, assim como outros radicais livres, tem efeito neurotóxico, levando a degeneração neuronal *in vitro* (DAWSON et al., 1994). A inibição da produção de NO em macrófagos provocada pela infecção de *T. gondii* é mencionada como mecanismo de evasão celular utilizada pelo parasita. Estudos *in vitro* com macrófagos demonstraram a habilidade de *T. gondii* em

diminuir a expressão da óxido nítrico sintase (NOS) em óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e consequentemente a produção de óxido nítrico (NO) (SEABRA et al., 2002; 2004).

Na citometria de fluxo, foram realizados testes utilizando sangue total de camundongos e também macerado cerebral, no intuito de estabelecer uma padronização para este teste com o modelo murino infectado pelas diferentes cepas de *T. gondii* e com isso, observar a possível neuroimunomodulação causada pela infecção parasitária. Obtivemos marcações positivas para os diferentes marcadores de superfície de células TCD4, TCD8, NK, TCD4/TCD8 de memória, TCD8a/DX5 e controles isotípicos IgG2b/IgG2a, porém alguns baixa intensidade de leitura, acreditamos que devido ao decaimento de fluorescência dos anticorpos.

A miocardite toxoplásmica é secundária à infecção direta dos miócitos pelo parasita. Na macroscopia, o coração adquire um aspecto globoso e flácido. Quando encontrado em fibras musculares, o cisto assume uma forma alongada. A ruptura dos cistos naturalmente gera uma reação inflamatória caracterizada por uma infiltração de células mononucleares (GERBERDING, 1992). Geralmente os cistos de *T. gondii* são encontrados principalmente no cérebro, fígado, musculatura cardíaca e esquelética (MAROBIN et al., 2004). Similar ao que é descrito na literatura, neste trabalho observamos sinais de miocardite em animais infetados com as cepas atípicas, mas não com cepas típicas. Investigação complementar por biologia molecular será realizada futuramente para comprovar o sucesso da infecção pelas cepas atípicas cistogênicas utilizadas neste trabalho.

8 CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido um modelo experimental em camundongos BALB/c para a avaliação da toxoplasmose com as diferentes cepas ME-49 , VEG, Isolado #19, Isolado #21 e um grupo controle. O número experimental de 120 camundongos nos permitiu chegar ao final do experimento ainda com animais vivos, para realização de testes e análise estatística;
- Foi observado que os camundongos infectados por ME-49 tiveram uma pequena variação de peso, quando comparado aos demais grupos. Outros sinais clínicos característicos da infecção por *T. gondii* como, pelos arrepiados, olhos serrilhados e elevado consumo de água, também foram observados nos grupos infectados, mas não no controle;
- A avaliação da soroconversão dos animais por ELISA foi observada apenas para a cepa ME-49, o que nos leva a acreditar que testes convencionais não são sensíveis para a detecção de infecção por cepas atípicas de *T. gondii*, uma vez que os animais infectados por cepas atípicas também apresentaram sinais clínicos e cistos cerebrais;
- A realização da dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess mostrou que a produção de NO nas amostras de soro não manteve um padrão de produção de NO, e a análise estatística realizada não mostrou diferença significativa entre os grupos. Porém, foi possível observar uma produção basal de NO no cérebro, no entanto, nenhuma produção significativa foi observada quando comparado os grupos infectados ao controle;
- Quanto a citometria, foram estabelecidas condições ideais de uso para os marcadores de superfície de células TCD4, TCD8, NK, TCD4/TCD8 de memória, TCD8a/DX5 e controles isotípicos IgG2b/IgG2a utilizando amostras de sangue e macerado cerebral de camundongos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. *Eur J Phamacol.*, v .405, p.167-76, 2000.
- AFONSO, C.; PAIXÃO, V.B.; COSTA, R.M. Chronic Toxoplasma infection modifies the structure and risk of host behaviour. *PLoS One.* v.7, p.1-5, 2012.
- AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. 2007. In: AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. *Toxoplasma molecular and cellular biology*. 1ª ed. Norfolk: Horizon Bioscience, 2007.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A.L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M., CARME, B., DARDE, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.*, v.34, p.1185-1196, 2004.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M.L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, p. 684-689, 2002.
- ALEIXO, A. L.Q.C.; BENCHIMOL, E.I.; NEVES, E.S.; SILVA, C.S.P.; COURA, L.C.; AMENDOEIRA, M.R.R. Frequência de lesões sugestivas de toxoplasmose ocular em uma população rural do Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, p. 165-169, 2009.
- ALVES, G.J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. *Rev Bras Psiquiatr.* V. 29, p.363-9, 2007.
- AMARAL, R.O.; AMARAL, R.P.; SAIDNEUY, A.E.K.T.; RIBEIRO, W.L.; ANDRADE, J. Serological profile of potencial solid organ donors in Santa Catarina, Brazil. *Transplantation Proceedings*, v. 40, p. 665-667, 2008.
- ASL, A.Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem*, v.41, n. 16-7, p. 1342-47, 2008.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med*, v.195(12), p. 1625-1633, 2002.

- BENJAMIN, J. L.; REMINGTON, S.J. Toxoplasmic Encephalitis, *The Journal of Infectious Diseases*, v. 157, p. 1–6, 1988.
- BERENREITEROVÁ, M.; FLEGR, J.; KUBĚNA, A.A.; NĚMEC, P. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PLoS One.*, v.6, 2011.
- BHADRA, R.; COBB, D.A.; WEISS, L.M.; KHAN, I.A. Psychiatric disorders in toxoplasma seropositive patients-the CD8 connection. *Schizophr Bull.*, v. 39:485-489, 2013.
- CALABRESE, V., MANCUSO, C., CALVANI, M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8, 766–775, 2007.
- CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.L.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.M.; SU, C.; JAUNÁRIO, J.N.; VITOR, R.W.A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.51, p. 901-907, 2013.
- DARDE, M.L. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite.*, v.15:366-371, 2008.
- DAWSON, V.L.; BRAHMBHATT, H.P.; MONG, J.A.; DAWSON, T.M. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures, *Neuropharmacology*, v.33(11), p. 1425-1430, 1994.
- DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.*, v. 55, p.467-475, 2008.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. Florida: CRC Press, p. 336, 2010.
- DUBEY, J.P.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; McLEOD, R. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strain (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology*, v. 139, p. 1-13, 2012b.
- DUBEY, J.P.; HILL, D.E.; JONES, J.L.; HIGHTOWER, A.W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J.M.; MARCET, P.L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M.C.B.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; GAMBLE, H.R. Prevalence of viable

Toxoplasma gondii in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *J Parasitol.*, v. 91: 1082-1093. 2005.

DUBEY, J.P.; ROLLOR, E.A.; SMITH, K.; KWOK, O.C.H.; THULLIEZ, P. Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. *J Parasitol.*, v. 83, p. 839-841. 1997.

DUBEY, J. P.; LAGO, E.G.; GENNARI, S.M.; SU, C.; JONES, J.L. Toxoplasmosis in human and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, v. 139, n.11, p. 1375-1424, 2012a.

FEKKAR, A.; AJZENBERG, D.; BODAGHI, B.; TOUAFEK, F.; HOANG, P. L.; DELMAS, J.; ROBERT, P.Y.; DARDÉ, M.L.; MAIZER, D.; PARIS, L. Direct Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Ocular Fluid Samples from 20 Patients with Ocular Toxoplasmosis: Predominance of Type II in France. *Journal of Clinical Microbiology*. v.49, p. 1513-1517, 2011.

FERREIRA, I.M.; De MATTOS, C.C.; FREDERICO, F.B.; MEIRA, C.S.; ALMEIDA, G.C.; NAKASHIMA, F.; BERNARDO, C.R.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; DE MATTOS, L.C. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiology & Infection*, v.142, p.142-148, 2014.

FERREIRA, I.M.; VIDAL, J.E.; MATTOS, C.C.B.; MATTOS, L.C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in São Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Experimental Parasitology*, v.129, p.190-195, 2011.

FLEG, J. Effects of toxoplasma on human behaviour. *Schizophrenia Bull.*, v.33, p.757-60, 2007.

FLEGR, J.; KODYM, P.; TOLAROVA, V. Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii* infection with personality changes in women. *Biological Psychology*, v. 53, p. 57-68, 2000.

FOROUTAN-RAD, M.; MAJIDIANI, H; DALVAND, S.; DARYANI, A.; KOOTI, W.; SAKI, J.; HEDAYATI-RAD, F.; AHMADPOUR, E. Toxoplasmosis in Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, v.30, p. 116-122, 2016.

- FUENTES, I.; RUBIO, J.M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol.*, v.2001, p.1566–1570, 2001.
- GERBERDING, J. L. Case records of the Massachusetts General Hospital. *Weekly clinic pathological exercises*. Case 36-1992.
- GILBERT, R.E.; FREEMAN, K.; LAGO, E.G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; TAN, H.K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANDFORD, M.R.; PETERSEN, E. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 2(8): e277, 2008.
- GOEBEL, S.; GROSS, U.; LUDER, C.G. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression. *J Cell Sci.*, v.114 (Pt 19):3495-505, 2001.
- GRAUMANN, K.; HIPPE, D.; GROSS, U.; LUDER, C.G. Mammalian apoptotic signaling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death. *Microbes infect.*, v. 11(13):1079-87, 2009.
- GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBIŃSKA-KIEĆ, A.; PANKIEWICZ, J.; WANAT, A.; ANNA, P.; GOŁĄBEK, I.; BARTUŚ, S.; MALCZEWSKA-MALEC, M.; SZCZUDLIK, A.. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, *Clinica Chimica Acta*, v.274, Issue 2, Pages 177-188, 1998.
- GULINELLO, M.; ACQUARONE, M.; KIM, J.H.; SPRAY, D.C.; BARBOSA, H.S. Acquired infection with *Toxoplasma gondii* in adult mice results in sensorimotor deficits but normal cognitive behavior despite widespread brain pathology. *Microbes and Infection*. V.12(7): 528–37, 2010.
- HALONEN, S.K.; WEISS, L.M. Toxoplasmosis. *Handbook of Clinical Neurology*, v. 114, p. 125-145, 2013.
- HARKER, K.S.; UENO, N.; LODOEN, M.B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol.*, v.37, p.141–149, 2015.
- HAROON, F.; HANDEL, U.; ANGENSTEIN, F.; GOLDSCHMIDT, J.; KREUTZMANN, P. *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. *PLoS One.*, v.7, 2012.

- HIGA, L.T.; GARCIA,J.L; SU, C.; ROSSINI, R.C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from pregnant women with follow-up of infected children in southern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.108, p. 244-246, 2014.
- HOWER, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.*, v.172:1561-1566, 1995.
- INGRAM, W.M., GOODRICH, L.M., ROBEY, E.A., EISEN, M.B. Mice infected with low-virulence strains of *Toxoplasma gondii* lose their innate aversion to cat urine, even after extensive parasite clearance. *PLoS ONE* 8, 2013.
- KEKLIKOGLU, N., KORAY, M., KOCAELLI, H. iNOS Expression in Oral and Gastrointestinal Tract Mucosa. *Dig Dis Sci* 53, 1437–1442, 2008.
- KHAN, A.; DUBEY, J.P; SU, C.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth lineage in North America. *Int J Parasitol.*, v.41:645-655, 2011.
- KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J.P.; DARDE, M.L.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad.*, v.104:14872-14877, 2007.
- KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G.A.; CLIFFORD, D.B.; SIBLEY, L.D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol.*, v.43:5881-5887, 2005.
- KOÇAK, O.M.; ATMACA, H.T.; TERZI, O.S.; OZDEMIR, H.; UZUNALIOGLU, T.; KUL, O. Experimental chronic Toxoplasmosis model in mice: Brain lesions and related behavioural changes. *Arch Neuropsychiatry*, v.49: 139-144, 2012.
- KOSHY, A.A.; DIETRICH, H.K.; CHRISTIAN, D.A.; MELEHANI, J.H.; SHASTRI, A.J. *Toxoplasma* co-opts host cells it does not invade. *PLoS Pathog.*, v.8(7), 2012.
- MAROBIN, L.; FLORES, M. L; RIZZATTI, B. B. Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) em diferentes criatórios do Estado do Rio Grande do Sul. *The Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, p.5-9, 2004.

- MELO, M.B.; JENSEN, K.D.; SAEIJ, J.P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol.*, v. 27:487-495, 2011.
- MITRA, R.; SAPOLSKY, R.M.; YVAS, A. *Toxoplasma gondii* infection induces dendritic retraction in basolateral amygdala accompanied by reduced corticosterone secretion. *Dis Model Mech.*, v.6:516-20, 2013.
- MONTOYA, J.G; LIESENFELD,O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.
- NICOLAS, M.; HASSAN, B.A. Amyloid precursor protein and neural development. *Development (Cambridge, England)*, v.141, 2543-2548, 2014.
- OLIVEIRA, P.A.; OLIVEIRA, F.C.; FARIA, L.M.J.; CADEMARTORI, B.G.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; COELHO, A.C.B.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A. Patogenicidade e virulência de *Toxoplasma gondii* isolado de suínos de criação artesanal no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, p. 1186-1190, 2014.
- OLIVEIRA, G.B.; SILVA, M.A.L.; WANDERLEY, L.B.; CORREIA, C.C.; FERREIRA, E.C.B.; MEDEIROS, Z.M.; FILHO, J.L.L.; MELO, F.L.; ARAÚJO, P.S.R.; SANTOS, A.H.C.M. Cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome in the neurological emergency department of a tertiary hospital. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 150, p. 23-26, 2016.
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M.E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v.39(12), p. 1385-1394, 2009.
- PARLOG, A.; SCHLUTER, D.; DUNAY, I.R. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol.*, v. 37(3):159-70, 2015.
- PERTERSEN, E.; KIJLSTRA, A.; STANFORD, M.; Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunology & Inflammation*, v.20, p. 68-75, 2012.
- PETERSEN, E., & DUBEY, J. Biology of toxoplasmosis. In D. Joynson & T. Wreghitt (Eds.), *Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide* (pp. 1-42). Cambridge: Cambridge University Press, 2011.

PRANDOVSKY, E.; GASKELL, E.; MARTIN, H.; DUBEY, J.P.; MCCONKEY, G.A. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolites. *PloS One.*, v.6(9), 2011.

RIETZE, R.; VALCANIS, H.; BROOKER, G. Purificação de uma célula-tronco neural pluripotente do cérebro de camundongo adulto. *Nature* v.412, 736-739, 2001.

SANDERS, A.P.; SANTOS, T.; FELIPE, C.K.K.; ESTEVÃO, M.L.; CÍCERO, C.; EVANGELISTA, F.; MANRIQUE, C.A.; MIZUTANI, A.S.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Ocular Lesions in Congenital Toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Paraná, Brazil. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v.36, p. 817-820. 2017.

SHWAB, E.K.; ZHU, X.Q.; MJUMDAR, D.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, v. 141, p. 453-461, 2014.

SIBLEY LD. Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* v39; p 915–924. 2009.

SIBLEY LD. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr Opin Biotechnol.*, v.21, p.592–598, 2010.

SIBLEY, L.D; MORDUE, D.; HOWE, D.K. Experimental Approaches to Understanding Virulence in Toxoplasmosis. *Immunobiology*, v201, p. 210-224, 1999.

SIBLEY, L.D; KHAN, A; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, v.364, p.2749-2761, 2009.

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG DARDE, M.L.; ZHU, X.Q.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v.109:5844-5849, 2012.

SUTTERLAND, A.L.; FOND, G.; KUIN, A.; KOETER, M.W.; LUTTER, R.; VAN GOOL, T. Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.*, v.132(3):161-79, 2015.

- SYN, G.; ANDERSON, D.; BLACKWELL, J.M.; JAMIESON, S.E. Epigenetic dysregulation of host gene expression in *Toxoplasma* infection with specific reference to dopamine and amyloid pathways. *Elsevier*, v.65, p.159-162, 2018.
- TONIN, A.A.; DA SILVA, A.S.; THOMÉ, G.R.; SANGOI, M.B.; OLIVEIRA, L.S. Influence of toxoplasmosis on acetylcholinesterase activity, nitric oxide levels and cellular lesion on the brain of mice. *Pathol Res Pract.*, v. 210(8):526-32, 2014.
- TORREY, E.F.; BARTKO, J.J.; LUN, Z.; YOLKEN, R.H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: A Meta-Analysis. *Schizophrenia Bulletin*, v.33(3), p.729-736, 2007.
- VERMA, S.K.; AJZENBERG, D.; RIVERA-SANCHEZ, A.; SU, C.; DUBEY, J.P. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from Portugal, Austria and Israel reveals higher genetic variability within the type II lineage. *Parasitology*, v. 142, p. 948-957, 2015.
- VILARES, A.; GARGATÉ, M.J.; FERREIRA, I.; MARTINS, S.; GOMES, J.P. Molecular and virulence characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated from humans in Portugal. *Parasitology Research*, v.116, p. 979-985, 2017.
- XIA, J.; CHENG, X.Y.; WANG, X.J.; PENG, H.J. Association between *Toxoplasma gondii* types and outcomes of human infection: a meta-analysis. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v.64, p.229-234, 2017.
- YAMAMOTO, L.; TARGA, L.S.; SUMITA, L.M.; SHIMOKAWA, P.T.; RODRIGUES, J.C.; KANUNFRE, K.A.; OKAY, T.S. Association of Parasite Load Levels in Amniotic Fluid With Clinical Outcome in Congenital Toxoplasmosis. *Obstetrics & Gynecology*, v. 130, p. 335-345, 2017.
- YVAS, A.; KIM, S.- K.; GIACOMINI, N.; BOOTHROYD, J.C.; SAPOLSKY, R.M. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.104, 6442– 6447, 2007.
- YVAS, A.; SAPOLSKY, R. Manipulation of host behaviour by *Toxoplasma gondii*: What is the minimum a proposed proximate mechanism should explain? *Folia parasitol*, v.57(2):88-94, 2010.
- YOLKEN, R.H.; DICKERSON, F.B.; TORREY, E.F. *Toxoplasma* and schizophrenia. *Parasite Immunol*, v. 31, p.706–715, 2009.

ANEXO 1

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

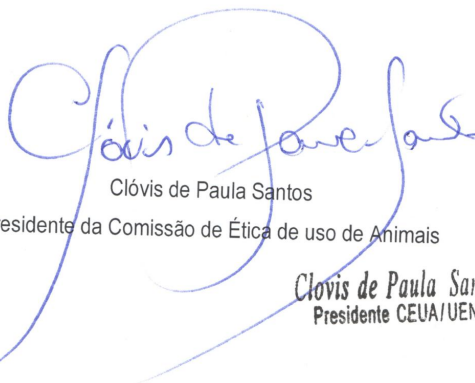


Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 385, intitulado "NEUROIMUNOMODULAÇÃO NA TOXOPLASMOSE: COMPARAÇÃO ENTRE CEPAS TÍPICAS E ATÍPICAS CISTOGÊNICAS DE TOXOPLASMA GONDII EM MODELO MURINO" sob a responsabilidade da Dra. Alba Lucinia Peixoto Rangel, Centro de Biotecnologia 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 27/11/2018. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 27/11/2022.

Campos dos Goytacazes, 27 de novembro de 2018.



Clóvis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

Clóvis de Paula Santos
Presidente CEUA/UENF