

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
YWLLIANE DA SILVA RODRIGUES MEURER

DISTRIBUIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH-DIAFORASE E TIROSINA HIDROXILASE
NA SUBSTÂNCIA NEGRA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO
Toxoplasma gondii.

BELÉM – PARÁ
2010

YWLLIANE DA SILVA RODRIGUES MEURER

**DISTRIBUIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH-DIAFORASE E TIROSINA HIDROXILASE
NA SUBSTÂNCIA NEGRA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO
Toxoplasma gondii.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre, pelo Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais – área Patologia, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Co-orientadores:

Prof. Dr. Antonio Pereira Junior.

Dr. Antonio Marcos Mello Moraes.

BELÉM – PARÁ

2010

MEURER, Ywlliane da Silva Rodrigues

DISTRIBUIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH-DIAFORASE E TIROSINA HIDROXILASE NA SUBSTÂNCIA NEGRA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *Toxoplasma gondii*. Belém – Pará, 2010, nº pgs 76.

Dissertação de mestrado em Doenças Tropicais – Universidade Federal do Pará- UFPA, Núcleo de Medicina Tropical – Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais, 2010.

1. *Toxoplasma gondii*; 2. NADPH-Diaforase; 3. Tirosina Hidroxilase.

I - Universidade Federal do Pará, Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

YWLLIANE DA SILVA RODRIGUES MEURER

DISTRIBUIÇÃO DAS ENZIMAS NADPH-DIAFORASE E TIROSINA HIDROXILASE NA SUBSTÂNCIA NEGRA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *Toxoplasma gondii*.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, área Patologia, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.
Instituto de Ciências Biológicas, ICB/UFPa.

Co-orientadores:

Prof. Dr. Antonio Pereira Junior.
Departamento de Neurociências, UFRN.

Dr. Antonio Marcos Mello Moraes
Fundação Santa Casa de Misericórdia – Pará.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ronald Marques dos Santos.
Universidade Federal Fluminense, UFF/RJ.

Prof. Dr. Cléa Nazaré Nascimento Bichara.
Universidade Estadual do Pará, UEPA/PA

Prof. Dra. Edilene Oliveira da Silva.
Instituto de Ciências Biológicas, ICB/UFPa.

Belém, Pará – 29 de Junho de 2010.

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial para meus pais e irmãos.

Aos meus amigos, em especial para minha grande amiga e irmã Valéria Palheta.

Aos meus orientadores.

Aos laboratórios, de Neuroquímica Molecular e Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará e de Biologia da Malária e Toxoplasmose da Universidade Federal do Rio Grande do Norte chefiado pelo Prof. Dr. Valter Andrade.

À CAPES e ao CNPq.

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório de prevalência mundial e importante causador de doenças em humanos e animais domésticos. No Brasil, até 80% da população pode estar infectada, dependendo da região. Os pacientes infectados agudamente geralmente apresentam infecção assintomática com posterior desenvolvimento de cistos teciduais, que são mais comumente encontrados nos músculos estriados, retina e cérebro. A infecção latente pode alterar o comportamento dos animais hospedeiros e provocar sintomas psicóticos em humanos. Estudos sugerem que esta infecção pode contribuir para a ocorrência de desordens neurológicas e psiquiátricas, como por exemplo, a doença de Parkinson e esquizofrenia, que são associadas com anormalidades do sistema dopaminérgico. Neste estudo, avaliou-se a imunoreatividade contra a enzima tirosina hidroxilase (TH) e a atividade da NADPH-diaforase na substância negra do cérebro de camundongos infectados. Camundongos machos da linhagem Swiss Webster (*Mus musculus*) receberam por gavagem 10 cistos contendo bradizoítos da cepa Me-49 do *Toxoplasma gondii*. Os cérebros destes camundongos foram removidos após eutanásia por decapitação após os períodos de 30 e 60 dias de inoculação. A análise das secções mostrou uma reduzida marcação histoquímica para NADPH-diaforase na substância negra dos animais infectados quando comparados com os animais controle. Esta redução foi observada também na imunoreatividade contra a enzima TH na substância negra. Estes resultados indicam que a presença do *T. gondii* modifica o metabolismo na região da substância negra, modulando os níveis de óxido nítrico (NO) e dopamina, o que pode ser responsável pelas alterações comportamentais presentes nos hospedeiros intermediários infectados.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a worldwide intracellular protozoan parasite and an important cause of disease in both humans and domestic animals. In Brazil, up to 80% of the population may be infected, depending on the region. Acute infection is generally asymptomatic, with posterior development of tissue cysts located mostly in muscles, retina and the central nervous system. The latent infection can alter behavior in animals and provoke psychotic symptoms in humans. Studies suggest that this infection may contribute to the occurrence of both schizophrenia and Parkinson's disease, which are associated with abnormalities of the dopaminergic system. In this study we evaluated immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) and NADPH-diaphorase activities in the *substantia nigra* of infected male swiss mice. The animals were inoculated with bradyzoites (10 cysts) from a *Toxoplasma gondii* (Me-49 strain). The brains were removed after 30 and 60 days, sectioned and submitted to protocols to reveal NADPH-diaforase activity and immunohistochemistry anti-TH. The densitometric analysis showed a lower reactivity to NADPH-diaforase in the *substantia nigra* of infected animals when compared with non-infected controls. A similar reduction was also observed in immunoreactivity against TH in the *substantia nigra*. These results indicate that *T. gondii* may change the dopaminergic system in infected brains.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação taxonômica do <i>Toxoplasma gondii</i>	13
Figura 2: Desenho esquemático da ultraestrutura dos três principais estágios infectantes do <i>T. gondii</i>	15
Figura 3: Estrutura de oocisto (A) não-esporulado, (B) esporulado, (C) esporulado em maior aumento, (D) estágio enteroepitelial do <i>T. gondii</i>	16
Figura 4: Fotomicrografia do taquizoíta (A) em cultura de fibroblastos, (B) formando rosetas intracelulares,(C) em fluido perivascular de tamo infectado, (D) em cérebro de camundongo, (E) ultraestrutura do taquizoíta	17
Figura 5: Cistos teciduais em cérebros de camundongos infectados pelo <i>T. gondii</i>	18
Figura 6: Subciclo sexuado do <i>T. gondii</i>	20
Figura 7: Ciclo de vida do parasita <i>T. gondii</i>	23
Figura 8: Representação da via nigral dopaminérgica	27
Figura 9: Esquema de síntese das catecolaminas	30
Figura 10: Esquema de síntese do óxido nítrico	32
Figura 11: Cistos da cepa Me-49 obtidos de macerado de cérebro de camundongos previamente infectados.....	36
Figura 12: Procedimento de inoculação do parasita realizado por gavagem com agulha curva ponta de bola.....	36
Figura 13: Desenho experimental utilizando modelo de infecção crônica com períodos de infecção C1 e C2, 30 e 60dias, respectivamente	37
Figura 14: Esquema de disposição das secções nas lâminas	37
Figura 15: Controle de peso dos animais controle e infectados (Período C1 e C2).....	41
Figura 16: Aparência de camundongos (A) não infectados e (B) infectados com o <i>T. gondii</i>	42

Figura 17: Marcação de cisto contendo a forma bradizoíta do <i>T. gondii</i> presente no parênquima cerebral próximo à região da substância negra no cérebro de camundongo infectado por 60 dias.....	43
Figura 18: Imunohistoquímica anti-TH na substância negra do cérebro de camundongos controle e infectados.....	44
Figura 19: Análise da densidade de neurônios dopaminérgicos da substância negra corados por imunohistoquímica para tirosina hidroxilase em camundongos infectados pelo <i>T. gondii</i>	45
Figura 20: Análise densitométrica da reatividade à NADPH-diaforase na neurópila da região da substância negra de cérebro de camundongos albinos swiss.....	46
Figura 21: Índice de contraste da neurópila entre os grupos controle e infectado (TX30 e TX60)	47
Figura 22: Análise densitométrica das secções marcadas pela histoquímica para NADPH-diaforase mostrando a região da substância negra do cérebro de camundongo controle e infectado	48

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.	REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1.	Histórico.....	12
1.2.	Agente etiológico	13
1.1.1.	Classificação	13
1.1.2.	Estrutura	14
1.1.2.1.	Oocisto	16
1.1.2.2.	Taquizoíta	18
1.1.2.3.	Bradizoíta	19
1.3.	Biologia e Ciclo Evolutivo	21
2.	MANIPULAÇÃO COMPORTAMENTAL NO HOSPEDEIRO	24
3.	SUBSTÂNCIA NEGRA E DOPAMINA	25
3.1.	Tirosina Hidroxilase	29
3.2.	Óxido Nítrico e NADPH-diaforase	31
4.	OBJETIVOS	34
4.1.	Objetivos Específicos	34
5.	METODOLOGIA	35
5.1.	Sujeito experimental	35
5.2.	Modelo experimental	35
5.3.	Desenho experimental	36
5.4.	Procedimento Experimental.....	37
5.4.1.	Coloração de Nissl	38
5.4.2.	Histoquímica para NADPH-diaforase	39
5.4.3.	Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase	39
5.5.	Análise dos dados	40
6.	RESULTADOS	41
6.1.	Controle de peso dos animais experimentais	41
6.2.	Localização do parasita nos animais experimentais	42
6.3.	Histologia, Imunohistoquímica e Contagem de Células Imunorreativas para Enzima Tirosina Hidroxilase	43
6.4.	Histoquímica para NADPH-diaforase	46
7.	DISCUSSÃO	49
8.	CONCLUSÃO	56
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Histórico

O protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) foi descoberto simultaneamente por dois grupos de pesquisadores em 1908. O primeiro grupo, liderado por Alfonso Splendore, chefe de laboratório no Hospital São Joaquim em São Paulo, constatou a presença de um parasita desconhecido em leucócitos de coelhos. O segundo grupo, liderado por Charles Nicolle, trabalhando no Instituto Pasteur na Tunísia, observou o mesmo microorganismo no baço, fígado, medula óssea e leucócitos do roedor norte africano *Ctenodactylus gondi*. Neste estudo, os autores incluíram o parasito no gênero *Leishmania*, chamando-o de *Leishmania gondii*. (NICOLLE, C. ; MANCEAUX, L., 1908; SPLENDORE, A., 1908) Contudo, após observarem diferenças entre os parasitas do gênero *Leishmania*, os autores o descreveram como uma nova espécie de parasita, o *Toxoplasma gondii*.

Apesar de parasitologistas considerarem a descrição feita por SPLENDORE superior à realizada por NICOLLE & MANCEAUX, estes últimos têm a prioridade da descoberta, segundo as normas do código de nomenclatura zoológica da época, já que foram os primeiros a dar um nome genérico e específico ao novo parasito.

Após a descoberta do parasito, as primeiras descrições de associação com afecções humanas datam de 1923 por JANKU e colaboradores, quando foi verificado o óbito de uma criança com hidrocefalia na antiga Tcheco-Eslováquia. Depois, em 1927, no Rio de Janeiro, TORRES e colaboradores observaram a presença do microorganismo em cortes histológicos da musculatura estriada e cérebro de um recém-nascido falecido após 29 dias de vida, proporcionando especulações acerca da ocorrência da transmissão congênita do novo parasita. Dez anos depois, em 1937, WOLF e colaboradores estabeleceram a transmissão vertical causada pelo *T. gondii* em crianças recém-nascidas.

Já em 1940, os autores PINKERTON & WEINMAN verificaram o papel etiológico do *T. gondii* no aparecimento de doença em adultos. Em 1958, LAINSON e colaboradores constataram o papel dos cistos na transmissão do parasito na natureza. O mesmo autor, em 1962, classificou taxonomicamente o *T. gondii* entre os coccídeos. Na década de 70 e 80, estudos demonstraram o papel de felinos como hospedeiro definitivo do parasito, bem como as suas diferentes formas de parasitismo. Posteriormente, muitos estudos avaliaram métodos terapêuticos e observaram as diferentes formas clínicas manifestadas após a infecção com o protozoário (WEISS, L. M. ; DUBEY, J. P., 2009). Recentemente, diversos estudos têm demonstrado a participação do *T. gondii* em disfunções do sistema nervoso, com ênfase no seu papel no desenvolvimento de alterações comportamentais em seus hospedeiros (BERDOY, M.; WEBSTER, J. P. ; MACDONALD, D. W., 1995; WEBSTER, J. P. et al., 2006; KANNAN, G. et al., 2010; WEBSTER, J. P. ; MCCONKEY, G. A., 2010).

1.2. Agente Etiológico

1.2.1. Classificação

O parasita está classificado taxonomicamente no REINO Protista, SUBREINO Protozoa, FILO Apicomplexa, CLASSE Sporozoea, SUBCLASSE Coccidia, ORDEM Eucoccidiida, SUBORDEM Eimeriina, FAMÍLIA Sarcocystidae, SUBFAMÍLIA Toxoplasmatinae, GÊNERO *Toxoplasma*, e ESPÉCIE *Toxoplasma gondii*. Esta espécie foi assim nomeada, por Nicole & Manceuax, devido a sua aparência em forma de arco, cujo termo é derivado da palavra grega *Toxon*.(Figura 1)

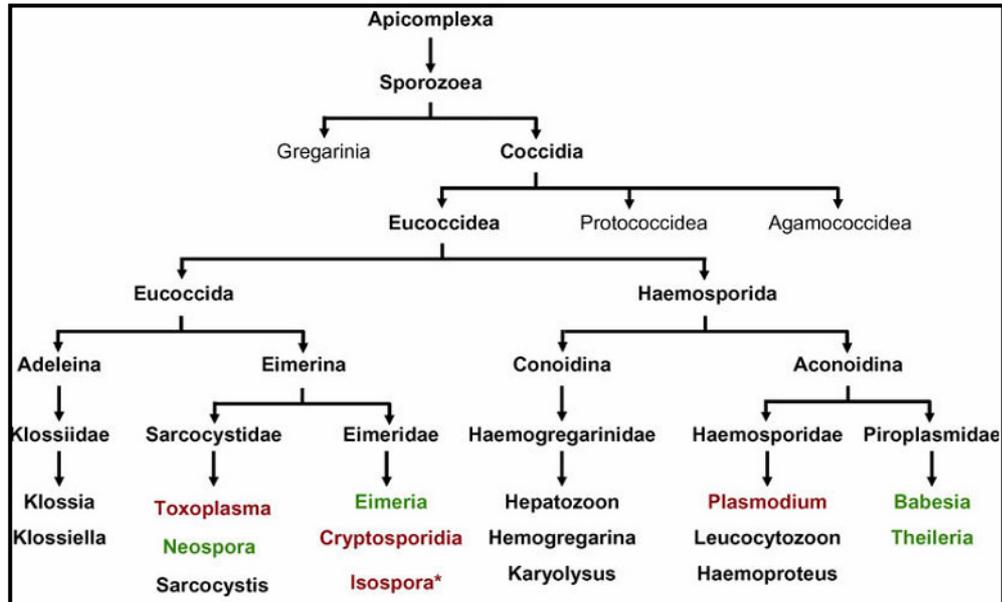


Figura 1: Classificação taxonômica do *Toxoplasma gondii*. (BECK, H.-P. et al., 2009)

1.2.2. Estrutura

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório que apresenta a capacidade de invadir e proliferar dentro de todo tipo celular nucleado em diferentes animais hospedeiros. Este parasita tem um ciclo de vida complexo – heteroxeno – no qual há a participação de dois hospedeiros, um definitivo e outro intermediário, para o seu desenvolvimento.

O ciclo definitivo ocorre no tecido enteroepitelial de felídeos, onde aparecem diferentes estágios morfológicos, com fases de desenvolvimento sexuada e assexuada, e liberação final de oocisto não-esporulado. No hospedeiro intermediário, no entanto, são encontradas duas formas predominantes do patógeno, a taquizoíta e a bradizoíta, que proliferam por endodiogenia dentro das células e tecidos de vários vertebrados, como peixes, aves e mamíferos, incluindo humanos (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998; ROBERTS, L. S.; SCHMIDT, G. D. ; JANOVY, J., 2009).

A análise ultraestrutural do parasita mostra que seu envoltório é composto por uma película composta de membrana plasmática e um complexo de duas membranas internas, além de um microporo. Seu núcleo é geralmente central e apresenta mitocôndria única, complexo de Golgi e retículo endoplasmático ramificado, além de uma organela peculiar do filo Apicomplexa chamada de apicoplasto (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998). Além disso, o *T. gondii* – assim como todos os parasitas do filo Apicomplexa – possui um complexo de estruturas peculiar ao filo e que confere grande capacidade invasiva, chamada de complexo apical. Esta estrutura possui grande importância na penetração ativa do parasita, e é constituída pelo conóide, anéis polares, róptrias, micronemas e grânulos densos (SAFFER, L. D. et al., 1992; DUBREMETZ, J. F., 1998; DUBREMETZ, J. F. et al., 1998; DUBREMETZ, J. F., 2007).

A penetração e internalização do parasita na célula hospedeira ocorrem por um mecanismo complexo e seqüencial de liberação de proteínas do micronema, róptria e grânulos densos. Para o reconhecimento na célula hospedeira, o parasita tem a habilidade de expressar em sua superfície algumas adesinas similares às presentes em mamíferos, que são deslocadas para a porção apical da superfície parasitária durante sua aproximação com a célula hospedeira. Esta aproximação facilita a exocitose de proteínas da róptria para a formação inicial de uma junção comunicante entre as membranas do parasita e da célula hospedeira (DUBREMETZ, J. F., 1998; 2007).

Após este evento é formado o vacúolo parasitóforo, que circunda o parasita no meio intracelular e possui uma membrana que difere substancialmente das vesículas endossomais, pois carregam as proteínas secretadas pela róptria e grânulos densos. Este mecanismo facilita a evasão do parasita de uma fusão fagolisossômica na via endo/exocítica celular, além de ser apontado como um recrutador de mitocôndria e retículo endoplasmático da célula hospedeira (SINAI, A. P. ; JOINER, K. A., 1997; SINAI, A. P.; WEBSTER, P. ; JOINER, K. A., 1997; MORDUE, D. G. et al., 1999a; MORDUE, D. G. et al., 1999b).

Todas estas modificações estabelecem um microambiente favorável para a persistência e proliferação do parasita dentro da célula hospedeira. Contudo, a multiplicação do parasita depende da forma infectante, haja vista que os três

estágios morfológicos importantes para infecção (esporozoíta, taquizoíta e bradizoíta) – apesar de serem ultraestruturalmente muito similares (Figura 2) – diferem na disposição de organelas e na expressão de proteínas na membrana do vacúolo parasitóforo (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A., 1998).

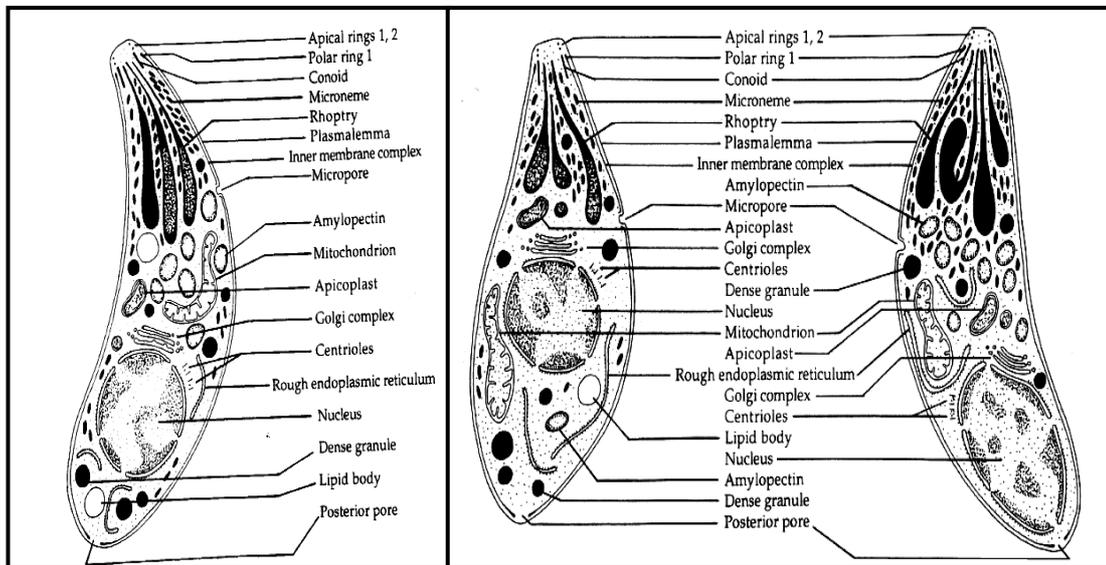


Figura 2: Desenho esquemático da ultraestrutura dos três principais estágios infectantes do *T. gondii*. Esporozoíta (esquerda), Taquizoíta (centro) e bradizoíta (direita). (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A., 1998)

1.2.2.1. Oocisto

O oocisto (não-esporulado) é um estágio resistente do *T. gondii*, cuja proliferação ocorre exclusivamente no tecido enteroepitelial de membros da família Felidae durante o período de 3-10 dias após ingestão de cistos teciduais e em média 19 dias após ingestão de taquizoítos ou oocistos. Durante o ciclo enteroepitelial, o parasita inicia o desenvolvimento através de fases de proliferação assexuada e sexuada.

A fase assexuada ocorre quando o hospedeiro ingere uma das três formas infectantes do parasita, as quais se proliferam por esquizogonia, gerando estágios morfológicos sucessivos (esquizonte, merozoítos e

micro/macrogametócitos). A formação e fertilização dos gametócitos iniciam a fase sexuada do ciclo enteroepitelial do parasita, originando o oocisto não esporulado, com uma forma esférica com 10-12 μ m de diâmetro, liberado nas fezes dos felídeos. O oocisto sofre maturação após 5 dias depois de liberado no meio ambiente, dependendo das condições do solo e do clima

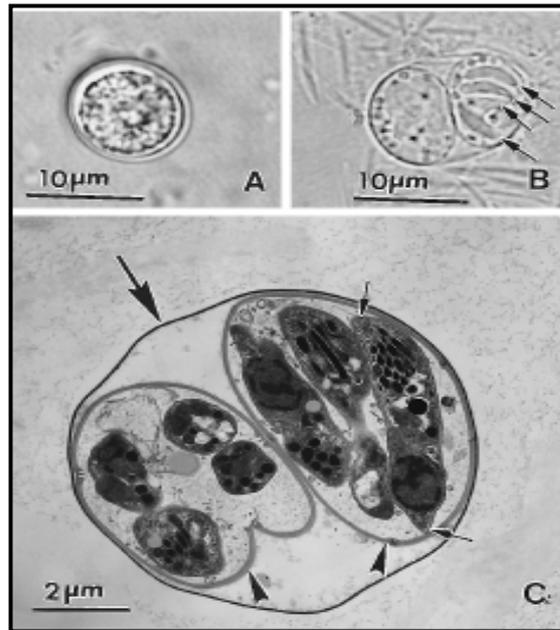


Figura 3: Oocisto do *Toxoplasma gondii* (A) Oocisto não-esporulado. Note a massa central (esporonte) ocupando todo o oocisto, (B) Oocisto esporulado com dois esporocistos, quatro esporozoítos (setas) estão visíveis em um dos esporocistos, (C) Micrografia eletrônica de oocisto esporulado. Note a parede do oocisto (seta longa), dois esporocistos (ponta de seta), e esporozoítos, um dos quais aparece em corte longitudinal (setas pequenas). (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998)

Após este processo, o oocisto torna-se esporulado, contendo em seu interior quatro a oito **esporozoítos** infectantes. Estes esporozoítos são então liberados nos intestinos do gato ou de outros hospedeiros, onde se dividem rapidamente gerando taquizoítos que invadem todos os tecidos e órgãos do hospedeiro. Esta invasão geralmente acarreta a formação de cistos teciduais que permanecem no hospedeiro durante toda a vida. (DUBEY, J. P., 1996a; b; BOOTHROYD, J. C. ; GRIGG, M. E., 2002; HILL, D. ; DUBEY, J. P., 2002)

1.2.2.2. Taquizoíta

Taquizoíta é um estágio que se multiplica rapidamente dentro das células do hospedeiro. Possui este nome devido à etimologia da palavra grega “tachys”, que significa rápido. Morfologicamente, apresenta uma estrutura em forma de arco (3 X 7 µm), um núcleo central, um pólo conoidal e outro arredondado (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998; BOOTHROYD, J. C. ; GRIGG, M. E., 2002; HILL, D. ; DUBEY, J. P., 2002). É encontrada principalmente na fase aguda da infecção dentro das células dos hospedeiros intermediários, sendo responsável pela sintomatologia (Figura 4).

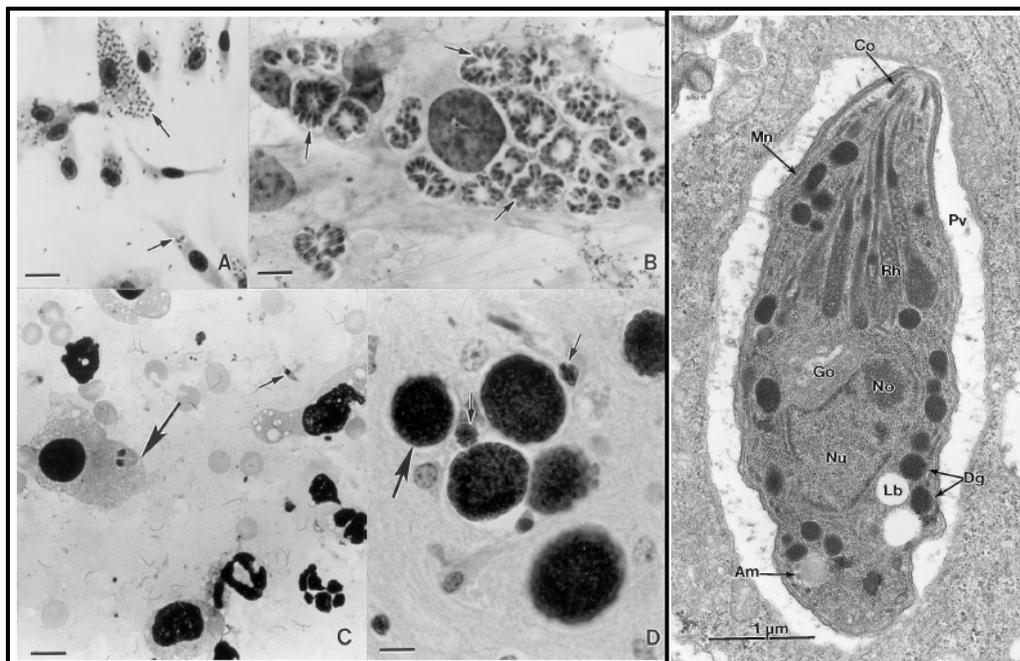


Figura 4: Fotomicrografia do taquizoíta (A) em cultura de fibroblastos (setas), (B) formando rosetas intracelulares (setas),(C) dividindo-se (seta larga) e avulsos (setas) em fluido pleural de felinos infectados corados com Giemsa, (D) em células nervosas (setas largas) macerado de cérebro de camundongo, (E) Fotomicrografia por transmissão eletrônica de taquizoítas (cepa VEG) do *Toxoplasma gondii* de células de exudato peritoneal de camundongos. Am, amilopectina; Co, conóide; Dg, grânulo eletro-denso; Go, Complexo de Golgi; Mn, micronema; No, nucléolos, Nu, núcleo; Pv, Vacúolo parasitóforo; Rh, róptria (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998)

Essa forma infectante pode penetrar em qualquer tipo celular nucleado do hospedeiro, multiplicando-se dentro de 4 a 6 horas no vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula, podendo romper a célula do hospedeiro e infectar as células adjacentes (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998; DUBREMETZ, J. F., 1998; BOOTHROYD, J. C. ; GRIGG, M. E., 2002; HILL, D. ; DUBEY, J. P., 2002; HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S. ; DUBEY, J. P., 2005).

1.2.2.3. Bradizoíta

Bradizoíta é a forma do *T. gondii* que se multiplica lentamente por endodiogenia no interior de cistos teciduais durante a fase crônica da infecção (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998). Este nome deriva da palavra grega “brady” que significa lento, devido às características do seu metabolismo. Os cistos teciduais formados por bradizoítas com tamanho que varia de 5-70 µm ocorrem em qualquer órgão. Contudo são mais comumente encontrados na musculatura estriada, na retina e no cérebro (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998; BOOTHROYD, J. C. ; GRIGG, M. E., 2002; HILL, D. ; DUBEY, J. P., 2002; MONTOYA, J. G. ; LIESENFELD, O., 2004; HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S. ; DUBEY, J. P., 2005).

Bradizoítas são morfologicamente semelhantes aos taquizoítas, sendo apenas um pouco mais alongados. Contudo, diferenças estruturais discretas, diferenças metabólicas, susceptibilidade a enzimas proteolíticas e diferenças antigênicas permitem a diferenciação dessas formas (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998) (Figura 5).

Os cistos teciduais contendo bradizoítas não causam prejuízo à célula hospedeira e podem permanecer durante anos sem provocar resposta inflamatória. Esta forma infecciosa é o principal meio de transmissão desta zoonose, através do carnivorismo e ingestão de carne crua ou mal cozida (BOOTHROYD, J. C. ; GRIGG, M. E., 2002; HILL, D. ; DUBEY, J. P., 2002) .

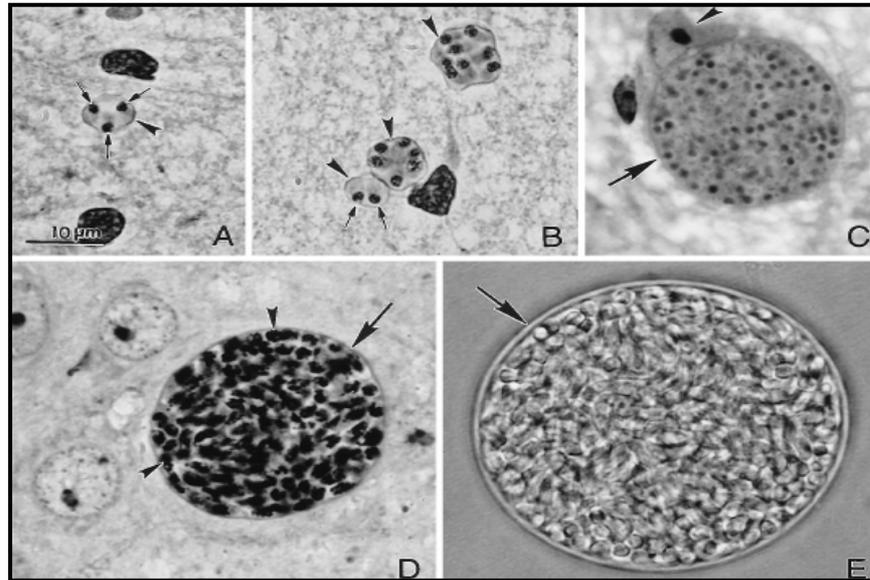


Figura 5: Cistos teciduais em cérebros de camundongos infectados pelo *T. gondii* (A) Cistos teciduais com três bradizoítas, cada um com um núcleo terminal (seta) e fina parede do cisto (ponta de seta). Esfregaço com impregnação pela prata e Giemsa (B) Três cistos teciduais com parede dos cistos bem definidas (ponta de seta). Note um cisto tecidual com dois bradizoítas, cada um com núcleo terminal (seta). Esfregaço com impregnação pela prata e Giemsa. (C) Secção com cisto tecidual intracelular. Note a fina parede do cisto tecidual (seta) e o núcleo da célula hospedeira (ponta de seta) Marcação com hemtoxilina e eosina. (D) Cistos teciduais com numerosos bradizoítas PAS-positivos (ponta de seta) cercados por uma parede de cisto PAS-negativa. Marcação com PASH. (E) Cisto tecidual livre no cérebro de camundongos. Note a parede do cisto (seta) envolvendo centenas de bradizoítas. Esfregaço não corado. (DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. ; SPEER, C. A., 1998).

Os cistos teciduais podem ser destruídos após congelamento a -20°C , quando expostos a temperaturas maiores que 65°C durante 4 minutos ou por irradiação γ (DUBEY, J. P. et al., 1990).

1.3. Biologia e Ciclo Evolutivo

A presença de diferentes estágios infecciosos e a capacidade de sobreviver em ambientes diversos permite ao *Toxoplasma gondii* dar continuidade à sua transmissão. Após a infecção com alimento ou água contaminada, no intestino do hospedeiro definitivo - os felídeos - ocorre a fase sexuada do ciclo enteroepitelial do parasito. Os esporozoítos ou bradizoítas liberados dos cistos ou oocistos no intestino destes animais penetram nas células epiteliais do lúmen intestinal, onde proliferam e amadurecem. Após passarem por processos como a esquizogonia e gametogonia serão liberados oocistos não-esporulados no meio ambiente durante uma a três semanas após a infecção no hospedeiro (DUBEY, J. P. et al., 1988)

A progressão do ciclo de vida do *T. gondii* ocorre quando os hospedeiros intermediários, dentre eles o homem, se infectam através da ingestão de carnes cruas ou malpassadas contaminadas com cistos teciduais e, através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos liberados das fezes dos felídeos infectados (FERGUSON, D. J., 2002; MONTOYA, J. G. ; LIESENFELD, O., 2004) . (Figura 6)

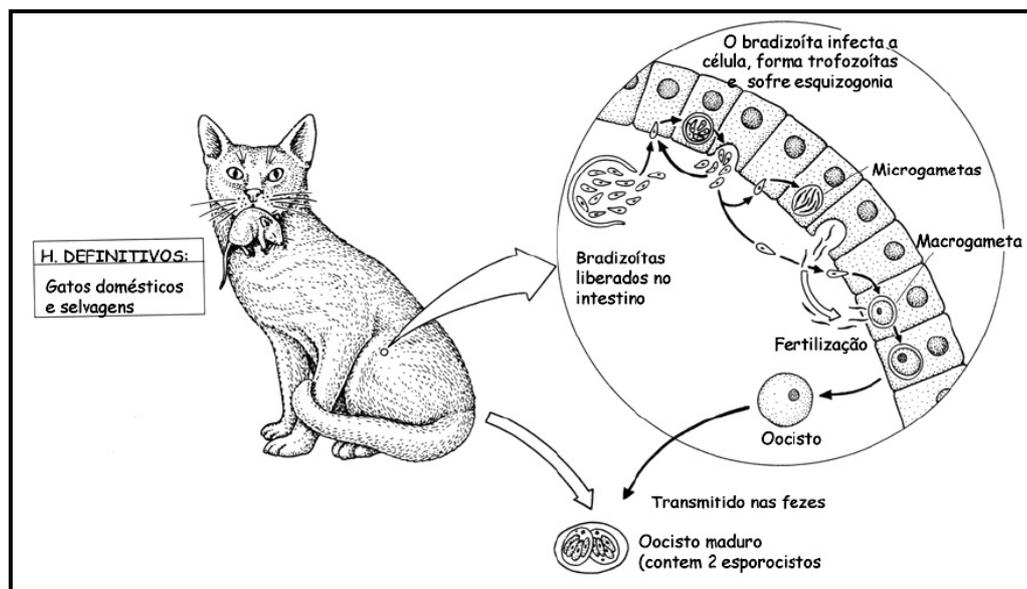


Figura 6: Ciclo de vida enteroepitelial do *T. gondii* em felídeos. (adaptado de Roberts & Janovy Jr, 2000).

A toxoplasmose utiliza duas principais rotas infecciosas no homem: a via oral e a via transplacentária. A primeira ocorre após a ingestão de oocistos ou cistos teciduais e a segunda pela transmissão placentária da forma taquizoíta da mãe para o feto (Figura 7). Outros mecanismos de infecção pelo *T. gondii* não são freqüentes, mas ainda assim possuem grande importância, como a transmissão em transfusões de sangue e derivados, em transplantes de órgãos (BARSOUM, R. S., 2006; VALAR, C. et al., 2007; DEROUIN, F. ; PELLOUX, H., 2008), ou a infecção acidental de profissionais da área da saúde (NEU, H. C., 1967).

A transmissão oral caracteriza a forma adquirida da doença, sendo a principal rota infecciosa. Neste caso, a participação dos felídeos tem bastante importância, pois a relação do homem com estes animais é relacionada com a continuação da propagação da infecção na natureza e na própria espécie humana (DUBEY, J. P. et al., 1988). A ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal-passadas são mencionados como a forma mais comum de transmissão da infecção nos adultos (BONAMETTI, A. M. et al., 1997). As crianças estão mais susceptíveis à infecção com os oocistos liberados nas fezes do gato, através de contaminação das mãos ou de alimentos (FRENKEL, J. K., 1996)

A transmissão transplacentária ocorre através da disseminação transplacentária da forma taquizoíta da mãe para filho, caso a mãe tenha se infectado pela primeira vez durante a gestação ou em algumas semanas antes da concepção do filho (ASPOCK, H. et al., 1994; FRIESE, K.; WEIGEL, M. ; MELCHERT, F., 1994; SWISHER, C. N.; BOYER, K. ; MCLEOD, R., 1994; VOGEL, N. et al., 1996; HILL, D. ; DUBEY, J. P., 2002). Geralmente a infecção da gestante é assintomática, sendo diagnosticada somente através da pesquisa de anticorpos em procedimentos laboratoriais. A gravidade da infecção para o feto dependerá do tamanho do inóculo, da virulência do parasito e do período em que ocorreu a infecção, sendo o primeiro e o segundo trimestre, os períodos onde podem ocorrer sérias conseqüências para o feto, causando uma forma clínica congênita, com malformações, morte do feto e aborto subsequente (MONTROYA, J. G. ; LIESENFELD, O., 2004)

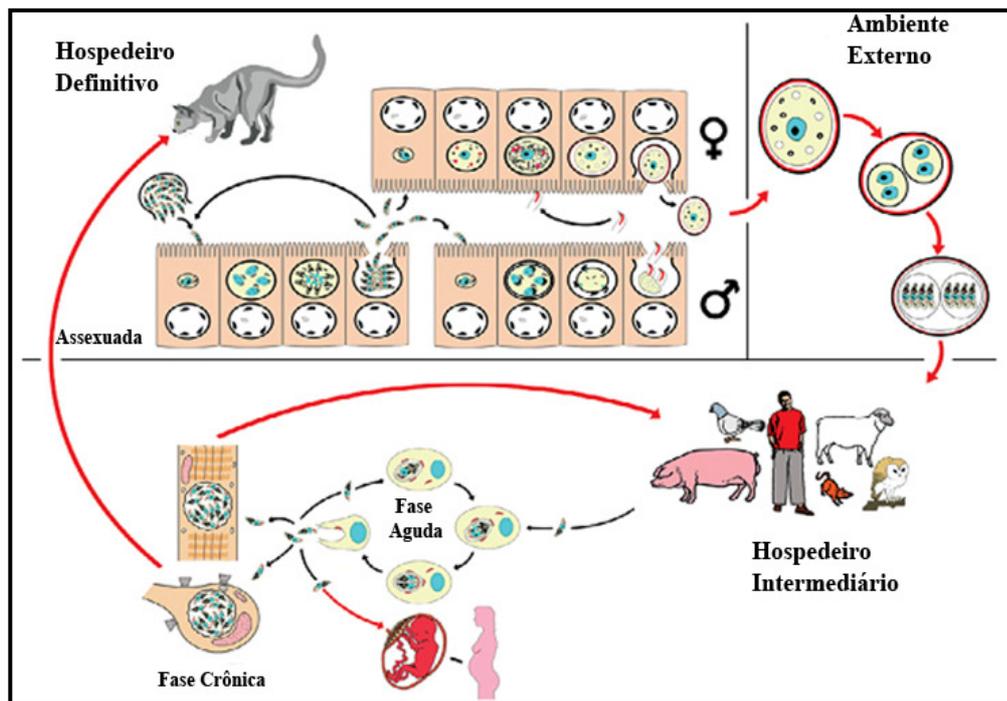


Figura 7: Ciclo de vida do parasita *Toxoplasma gondii* (FERGUSON, D. J., 2002).

Muitos recém-nascidos apresentam infecção congênita subclínica, e assintomática. Contudo, mesmo crianças imunocompetentes podem desenvolver tardiamente sintomas relacionados à doença, como retinocoroidite ou um leve retardo mental. Quando infectadas desde o nascimento, elas mantêm-se soropositivas para o *T. gondii*, com cistos distribuídos em diversas regiões do corpo, tais como, o cérebro, a retina e músculos estriados, durante toda a vida (STEINBROOK, R. ; DRAZEN, J. M., 2001)

2. MANIPULAÇÃO COMPORTAMENTAL NO HOSPEDEIRO

Inúmeros estudos têm sugerido que o protozoário *T.gondii* pode influenciar o comportamento de seus hospedeiros. Foram observados déficits no desempenho e coordenação motora e na capacidade de aprendizado e de memória em camundongos infectados (WITTING, P. A., 1979; HUTCHISON, W. M.; AITKEN, P. P. ; WELLS, B. W., 1980) Também foi descrita a pouca habilidade do animal infectado na discriminação entre animais da mesma colônia, além da reduzida incidência de fuga de predadores (BERDOY, M.; WEBSTER, J. P. ; MACDONALD, D. W., 1995; 2000; VYAS, A. et al., 2007; VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007).

Em estudos com humanos, pacientes com toxoplasmose crônica apresentaram o desempenho psicomotor alterado quando comparado a pacientes não infectados (HAVLICEK, J. et al., 2001). Além disso, foi relatado também que pacientes com toxoplasmose crônica apresentam mudanças específicas de personalidade (FLEGR, J. et al., 1996; FLEGR, J.; KODYM, P. ; TOLAROVA, V., 2000; FLEGR, J., 2007; 2010)

Os mecanismos fisiopatológicos pelos quais o *T. gondii* promove as alterações comportamentais em seus hospedeiros ainda necessitam ser elucidados, contudo vários autores sugerem duas hipóteses principais. A primeira hipótese sustenta que as mudanças comportamentais ocorrem apenas pela presença dos produtos liberados durante o processo inflamatório e da encefalite decorrentes da infecção (HAY, J. et al., 1983; HRDA, S. et al., 2000). Entretanto, é de se notar que existem outras infecções que atingem o SNC causando encefalite, mas não causam alterações comportamentais semelhantes (WEBSTER, J. P., 1994).

A segunda hipótese propõe que o desenvolvimento dos cistos teciduais no cérebro pode afetar os níveis de certos neurotransmissores e seus metabólitos. Em camundongos foi observada a presença ou a reativação de cistos teciduais distribuídos ao longo de todo tecido nervoso, com localização no córtex frontal e parietal, além de infiltração do parasita na amígdala, hipotálamo, putamen caudado

e hipocampo (BARRAGAN, A. ; SIBLEY, L. D., 2002; SHANKAR, S. K. et al., 2005; DELLACASA-LINDBERG, I.; HITZIGER, N. ; BARRAGAN, A., 2007; VYAS, A. et al., 2007; VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007). Em humanos, estudos com a utilização de imageamento por ressonância magnética demonstraram a presença do parasito no lobo frontal e parietal, bem como no gânglio basal (POST, M. J. et al., 1983; PORTER, S. B. ; SANDE, M. A., 1992; NAQI, R.; AZEEMUDDIN, M. ; AHSAN, H., 2010; SUZUKI, K. et al., 2010)

A infecção pelo *T. gondii* no SNC tem sido sugerida como causadora de distúrbios na liberação de neurotransmissores, tanto experimentalmente em animais quanto em acompanhamento de casos clínicos humanos. BERDOY e colaboradores (2000) sugeriram que a diminuição da aversão do rato ao seu predador natural é similar à diminuição da fuga logo após a administração de antagonistas de serotonina e de receptores N-methyl-D-aspartato (NMDA). Uma contribuição importante para essa segunda hipótese foi dada por STIBBS (1985), quando o mesmo descreveu o aumento das concentrações de dopamina em homogenizados de cérebro de camundongos infectados com o *T. gondii*. (STIBBS, H. H., 1985; BERDOY, M.; WEBSTER, J. P. ; MACDONALD, D. W., 2000)

Resultados de algumas pesquisas confirmam a relação entre a infecção latente pelo *T. gondii* e alterações comportamentais em humanos, sugerindo a participação de componentes dopaminérgicos (FLEGR, J. et al., 2003). Apesar da relação com a dopamina ainda não ter sido definitivamente comprovada, muitos estudos, tanto em humanos quanto em animais experimentais, demonstram claramente a associação da infecção com o sistema dopaminérgico (KABBAJ, M. ; AKIL, H., 2001; SKALLOVA, A. et al., 2006)

3. SUBSTÂNCIA NEGRA E DOPAMINA

A dopamina é uma amina biogênica integrante do grupo das catecolaminas que se caracterizam por apresentar na sua estrutura um grupo catecol e uma amina em um grupo lateral. Existem outras duas catecolaminas que

atuam como neurotransmissores: a noradrenalina e adrenalina (GRAYBIEL, A. M., 1990; PARENT, A., 1990).

Os axônios de neurônios dopaminérgicos formam três grandes vias ascendentes: a via nigro-estriatal, a via mesolímbica/mesocortical e a tuberohipofiseal. Os corpos celulares dos neurônios dessas vias estão localizados no mesencéfalo, principalmente na substância negra *pars compacta* (SNc, A9) e na área tegmental ventral (ATV, A10) (DAHLSTROEM, A. ; FUXE, K., 1964; NEDERGAARD, O. A., 1988; GRAYBIEL, A. M., 1990; PARENT, A., 1990). Além disso, existem alguns interneurônios dopaminérgicos no córtex olfativo, medula e retina (FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997; MOORE, R. Y., 2003). (Figura 8)

A via nigroestriatal dopaminérgica tem origem na SNc e termina na parte dorsal do corpo estriado (putamen-caudado ou CPu), também conhecido como *striatum* dorsal (DAHLSTROEM, A. ; FUXE, K., 1964; FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997). Uma pequena parte da via nigroestriatal consiste em axônios de corpos celulares na área A8 (neurônios dopaminérgicos caudal de A9 e dorsal a A10) projetando-se para o putamen ventral (FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997). Axônios da via nigroestriatal seguem junto a fibras contendo noradrenalina e 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) através do feixe medial prosencefálico (FMP) e cápsula interna para o striatum (MOORE, R. Y., 2003).

A via mesolímbica/mesocortical dopaminérgica tem corpos celulares localizados na área tegmentar ventral (ATV) e seus axônios cursam medialmente aos axônios da via nigroestriatal pelo FMP, oriundos de estruturas límbicas e corticais (DAHLSTROEM, A. ; FUXE, K., 1964; DI CHIARA, G., 2002; MOORE, R. Y., 2003) Um ramo desses neurônios, o ramo mesolímbico, inerva o núcleo accumbens (NAc), a amígdala, o hipocampo, o septo e o tubérculo olfatório enquanto o outro, a via mesocortical, inerva o córtex límbico, além do córtex pré-frontal medial, córtex cingulado e entorrinal (NIEOULLON, A., 2002)

Ambas as vias dopaminérgicas, via nigroestriatal e mesolímbica, estão envolvidas no controle de movimentos. A liberação de dopamina no CPu, por

exemplo, tem um papel fundamental na função dos gânglios basais e é crucial para o controle de movimentos voluntários. Se a transmissão dopaminérgica é interrompida, como ocorre na doença de Parkinson e na de Huntington, a geração de movimentos é prejudicada. A via mesolímbica também está envolvida na atividade locomotora, mas o papel do núcleo accumbens (NAc) é melhor estabelecido em processos de recompensa e de reforço (SCHULTZ, W.; DAYAN, P. ; MONTAGUE, P. R., 1997) .

Recentemente, o CPu tem sido relacionado à processos de iniciação e regulação de uma variedade de comportamentos, como por exemplo, formação de hábitos através do uso da informação armazenada acerca dos padrões fixos de ação, ou seja, de comportamentos estereotipados(GERDEMAN, G. L. et al., 2003) .

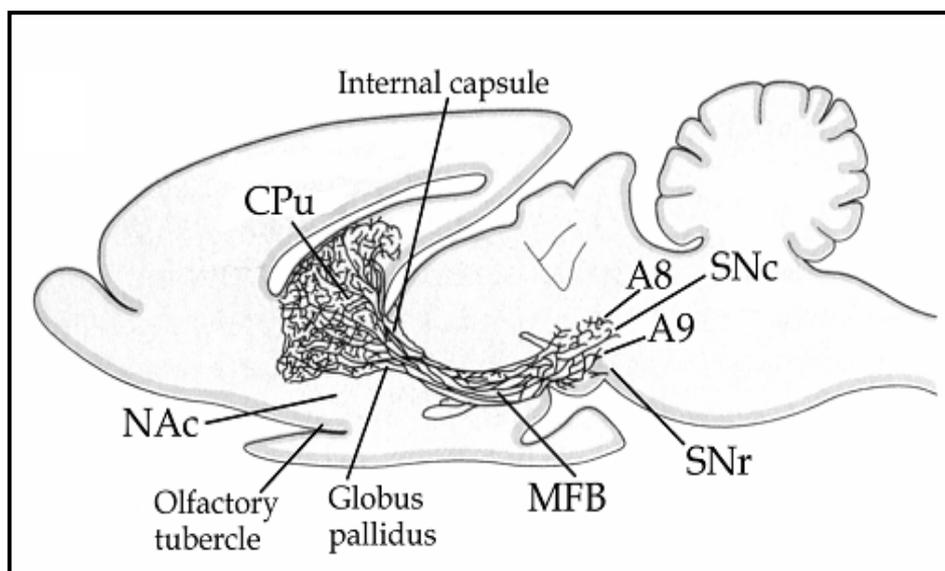


Figura 8: Representação da via nigral dopaminérgica. (FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997)

Além disso, outros estudos suportam a idéia da participação do CPu em mecanismos de plasticidade sináptica de longo prazo, o que pode ocorrer em combinação com processos similares no NAc). Além disso, alterações funcionais nas conexões do NAc provocam plasticidade sináptica no CPu por influenciar o fluxo de informação através da via subcortical (FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997; GERDEMAN, G. L. et al., 2003) .

A DA é o neurotransmissor majoritário da via nigro-estriatal e possui um papel modulador no controle dos movimentos complexos. As funções exercidas pela dopamina no núcleo estriado são de grande importância clínica e várias doenças neurológicas, como Parkinson, ocorrem devido a disfunções na neurotransmissão dopaminérgica.

A substância negra subdivide-se em parte reticulada (SNr) e parte compacta (SNc). A SNr recebe as projeções do globo pálido (GPi) e está funcionalmente relacionada a este. A SNc é um núcleo distinto localizado dorsalmente à SNr. Suas células são dopaminérgicas e possuem um pigmento escuro denominado neuromelanina que, com a idade, acumula-se nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos ocasionando uma coloração escura, daí o nome dado a essa estrutura (KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. ; JESSELL, T. M., 2000). A DA liberada dos terminais nervosos dos neurônios localizados na SNc modula a atividade das células estriatais (GRAYBIEL, A. M., 1998).

As relações existentes entre a substância negra e regiões do córtex cerebral estão evidenciadas principalmente por estudos em que lesões realizadas subcorticalmente causam conseqüências comportamentais relacionadas à regiões corticais, como o córtex pré-frontal. Neste contexto realça-se o elevado grau de convergência entre estruturas da via cortico-estriatais e cortico-nigrais, o que representa uma integração entre as atividades de diferentes áreas corticais em nível subcortical (KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. ; JESSELL, T. M., 2000; DI CHIARA, G., 2002; NIEOULLON, A., 2002).

Alterações farmacológicas sobre os receptores de neurotransmissores nas vias de entrada presentes na ATV e na SN causam alterações na liberação de dopamina em áreas que recebem aferências destas, como o NAc e o GPu (COBB, W. S. ; ABERCROMBIE, E. D., 2002; ERHARDT, S. et al., 2002). O CPu é preferencialmente inervado por várias regiões associativas e áreas sensório-motoras corticais, enquanto o NAc recebe projeções de estruturas límbicas, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (PARENT, A., 1990). Logo, estão presentes nestas estruturas diferentes interações entre regiões do sistema nervoso, assim como diferenças nos neurotransmissores encontrados que interagem com a via dopaminérgica no striatum dorsal e ventral (GRAYBIEL, A. M., 1990).

3.1. TIROSINA HIDROXILASE

A dopamina e as outras catecolaminas em geral são sintetizadas a partir do aminoácido tirosina, que é captado diretamente da circulação sanguínea. A tirosina é um aminoácido semi-essencial que pode ser obtido pela alimentação ou ser sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina no fígado. Ela chega ao cérebro após atravessar a barreira hematoencefálica através de um sistema de transporte específico para aminoácidos neutros (GRAYBIEL, A. M., 1990).

Para a síntese de dopamina, a tirosina sofre dois processos bioquímicos de transformação. Primeiro, ela sofre hidroxilação por ação da enzima tirosina hidroxilase para ser transformada em L-DOPA. Este é o passo limitante da síntese de catecolaminas, sendo seus co-fatores o oxigênio molecular e a tetrahydrobiopteridina (BH4). A tirosina hidroxilase é uma enzima formada por um tetrâmero de 4 subunidades idênticas e é estereoespecífica (somente age sobre a L-tirosina e citosólica (FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997).

A tirosina hidroxilase exerce seu efeito regulador de forma muito rápida, o que permite uma adaptação rápida às mudanças extracelulares ou à atividade neuronal que, por sua vez, necessita ajustar-se à biossíntese das catecolaminas (CHO, J. Y. et al., 1996; FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997)

Durante a hidroxilação da tirosina em L-DOPA, a tirosina hidroxilase em sua forma reduzida (ativa) oxida-se dando origem a uma forma inativa. A reativação da enzima ocorre por meio da coenzima BH4 através da doação de dois hidrogênios (NEDERGAARD, O. A., 1988; FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997)

A segunda etapa refere-se ao processo em que a L-DOPA é descarboxilada pela ação da enzima dopa-decarboxilase para a produção de dopamina. Diferente da tirosina hidroxilase, a DOPA descarboxilase não é específica para o substrato, podendo ser encontrada em outros tipos celulares além dos

neurônios dopaminérgicos (NEDERGAARD, O. A., 1988; FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S. ; QUENZER, L. F., 1997)

A síntese de dopamina é localmente regulada por vários mecanismos, dentre eles: retroalimentação por acúmulo de dopamina, mudanças alostéricas na atividade enzimática, disponibilidade do precursor tirosina ou por ação de autoreceptores.

Uma vez sintetizada, a dopamina é armazenada em vesículas sinápticas até ser liberada por um mecanismo excitatório dependente de cálcio, quando um potencial de ação alcança o terminal sináptico. A dopamina pode então difundir-se e interagir com receptores tanto pré quanto pós-sinápticos. Esta interação estimula uma cascata de efeitos via ação de segundos mensageiros, o que resulta em diversas mudanças incluindo a ativação de canais iônicos e indução de fatores de transcrição (STONE, T. W., 1996).

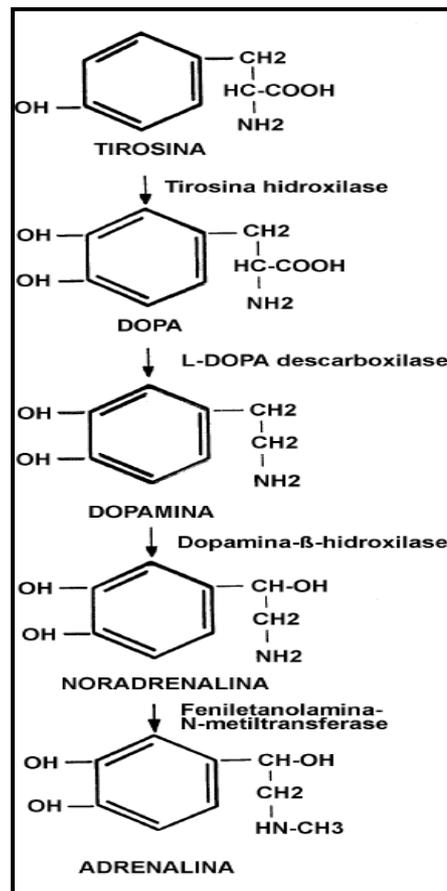


Figura 9: Esquema de síntese das catecolaminas.

A liberação de dopamina pode ser regulada pela atividade glutamatérgica dentro do estriado. Assim, o glutamato pode aumentar a liberação de dopamina estriatal através de uma influência local (GIORGUIEFF, M. F.; KEMEL, M. L. ; GLOWINSKI, J., 1977). Em condições normais, tanto a síntese quanto a liberação de dopamina estão inibidas pela própria dopamina através de uma alça de retroalimentação. Neste caso, a dopamina agiria sobre o transportador de dopamina (aumentando sua captação) e também mantendo uma inibição tônica sobre os terminais glutamatérgicos (através de uma ação sobre os receptores pós-sinápticos) (STONE, T. W., 1996).

3.2. ÓXIDO NÍTRICO E NADPH-DIAFORASE

O óxido nítrico (ON) é um pequeno gás instável e bastante lipossolúvel com difusão facilitada no sistema nervoso central, através de neurônios pré e pós-sináptico. O ON é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (ONS) através da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina. O ON participa de diversas e importantes ações fisiológicas e patofisiológicas nos mamíferos, entre as quais está a regulação do fluxo sanguíneo cerebral, metabolismo, neurotransmissão, neurogênese, plasticidade sináptica e apoptose. Dependendo do seu estado oxidativo e de sua concentração, o óxido nítrico poderá atuar como agente neuroprotetor ou neurotóxico (DAWSON, T. M. et al., 1991; DAWSON, V. L. et al., 1993; RAUHALA, P.; ANDOH, T. ; CHIUEH, C. C., 2005)

Classicamente, as enzimas ONS são identificadas como: neuronal (nONS), endotelial (eONS) e induzível (iONS). As isoformas neuronal e endotelial são dependentes de cálcio/calmodulina, presentes em neurônios e células endoteliais, respectivamente. A forma induzível é independente de cálcio/calmodulina, com expressão em macrófagos e outras células a partir da estimulação por citocinas (SZABO, C., 1996).

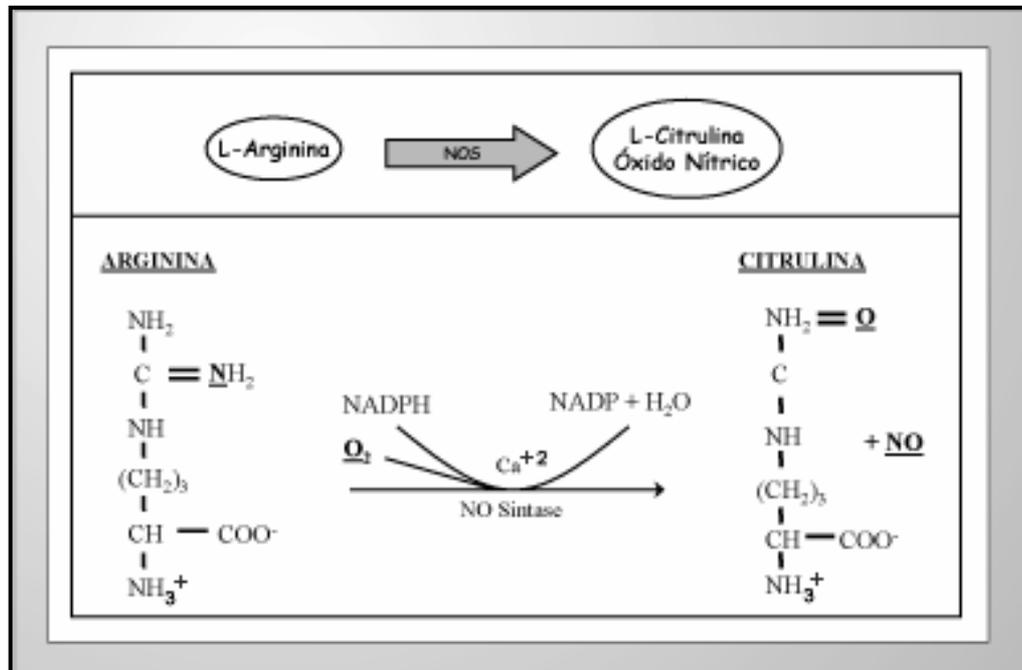


Figura 10: Esquema de síntese do óxido nítrico.

Todas as isoformas da enzima são expressas no SNC, onde são especificamente localizadas. Além disso, todas utilizam como co-substratos a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e oxigênio molecular, além de todas apresentarem algum grupo prostético. A presença desses substratos facilitou o desenvolvimento de métodos bioquímicos e histoquímicos que demonstram a presença da enzima devido à estrita co-localização entre a enzima co-substrato e a enzima de síntese do óxido nítrico.

A NADPH-d (diaforase para nicotinamida dinucleotídeo fosfato) encontra-se bastante distribuída no SNC de mamíferos. Além disso, é uma enzima importante para a síntese de ON (DAWSON, T. M. et al., 1991). Desta forma, a histoquímica para a revelação da NADPH-d constitui-se em método eficaz tanto para localização de neurônios que sintetizam ON no SNC quanto para a investigação da distribuição

da enzima de síntese deste gás pelo tecido neural (DAWSON, T. M. et al., 1991; FREIRE, M. A. et al., 2007).

A expressão de ONS no tecido nervoso pode ser alterada por diversos fatores, sendo que muitos apresentam alterações na regulação de expressão das diferentes isoformas de ONS. É importante ressaltar que alterações na expressão e nos níveis da enzima ONS podem ocasionar a modulação na liberação, expressão ou recaptação de vários neurotransmissores, como o glutamato, a dopamina e o GABA.

Estudos demonstraram uma modulação da liberação de GABA causada por um aumento na liberação de ON em terminais pré-sinápticos do tálamo (YANG, S. ; COX, C. L., 2007). Tal resultado corroborou outros estudos que verificaram o mesmo efeito em outras regiões do SNC (KRAUS, M. M. ; PRAST, H., 2002; LI, D. P.; CHEN, S. R. ; PAN, H. L., 2002). Um dado interessante e relevante nesta relação, entre o GABA e ON, é que além deste último influenciar na liberação de neurotransmissores como o GABA, a sua fonte está presente em neurônios GABAérgicos. Mostrando que o ON e o GABA estão co-localizados em diversas regiões cerebrais e que esta associação pode ter uma importante influência sobre as funções desempenhadas por determinada região (MCCAULEY, A. K.; CARDEN, W. B. ; GODWIN, D. W., 2003).

No tecido cerebral infectado pelo *T. gondii*, o ON e seus metabólitos tóxicos são liberados pela microglia mediante ativação com o INF- γ e TNF- α para o controle da infecção aguda e manutenção do estado benigno e crônico da infecção. Estes mesmos mediadores podem apresentar atividade neurotóxica, causando dano ao tecido (SUZUKI, Y. et al., 2000; WILSON, E. H. ; HUNTER, C. A., 2004).

4. OBJETIVO

Avaliar os efeitos do *T. gondii* sobre a via nigral dopaminérgica no sistema nervoso de camundongos cronicamente infectados pelo *Toxoplasma gondii*.

4.1. ESPECÍFICOS

- 4.1.1. Verificar a localização do parasita *T. gondii* na substância negra no cérebro dos camundongos em períodos de infecção crônica.
- 4.1.2. Avaliar o padrão de reatividade da NADPH-diaforase na substância negra no cérebro dos camundongos em períodos de infecção crônica.
- 4.1.3. Verificar a distribuição da enzima tirosina hidroxilase na substância negra no cérebro dos camundongos em períodos de infecção crônica.

5. METODOLOGIA

5.1. Sujeito Experimental

Foram utilizados 20 camundongos machos (espécie *Mus musculus*) albinos da linhagem Swiss (idade: 4-8 semanas; peso: 35-40g), oriundos do Biotério do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12:12 controlado por um temporizador, com início da fase clara às 6:00h, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos por uma janela temporal de dois períodos (C1=30dias; e C2=60 dias) como representado na tabela abaixo:

Períodos	C1 30 dias	C2 60 dias	Total
Controle	5	5	10
10 cistos Me-49	5	5	10

Tabela 1: Grupos experimentais e períodos de infecção com o *T. gondii*.

5.2. Modelo Experimental

A cepa do *T. gondii* utilizada foi cepa Me-49, tipo II, mantida *in vivo*, com passagens a cada 8 semanas em camundongos albinos swiss (*Mus musculus*) através da inoculação de 50 cistos obtidos a partir da maceração do cérebro de camundongos previamente infectados (Figura 11).

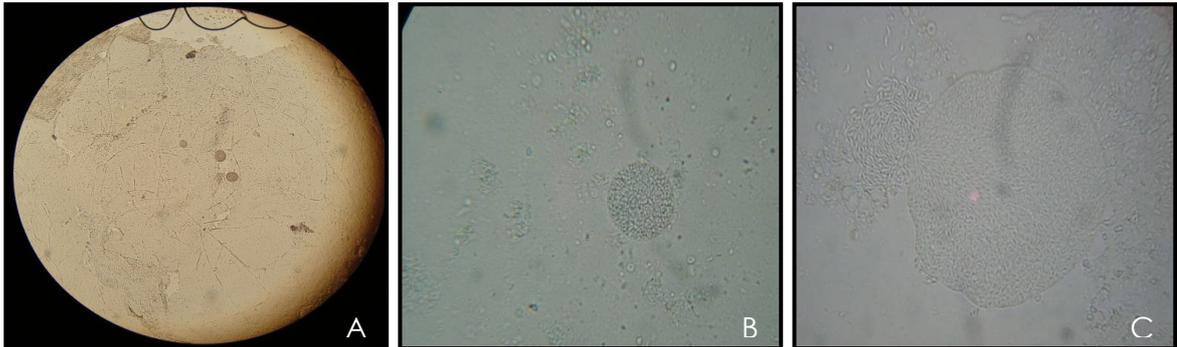


Figura 11: Cistos da cepa Me-49 obtidos de macerado de cérebro de camundongos previamente infectados. (A) Cistos observados na objetiva 4X. (B) Cisto observado na objetiva de 10X. (C) Cisto observado na objetiva de 40X.

Neste trabalho foram inoculados 10 cistos em cada animal experimental através de gavagem com agulha de aço boleada na ponta para evitar ferimentos no trato digestivo superior ou no trato respiratório dos animais (Figura 12).

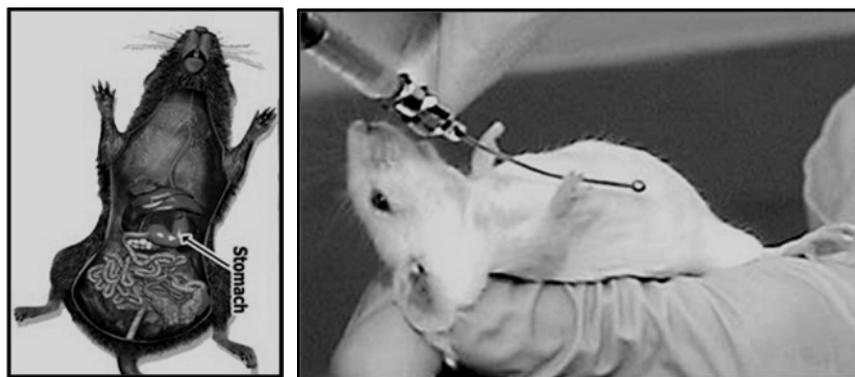


Figura 12: Procedimento de inoculação do parasita realizado por gavagem com agulha curva ponta de bola.

5.3. Desenho Experimental

No presente trabalho, foram utilizados 20 animais, machos, com 1,5 a 2 meses de idade, os quais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: C1 e C2, período de infecção de 30 dias e 60 dias, respectivamente. Cada grupo continha 10

animais, que foram novamente divididos aleatoriamente em grupo controle (n=5) e grupo infectado (n=5) (Figura 13).

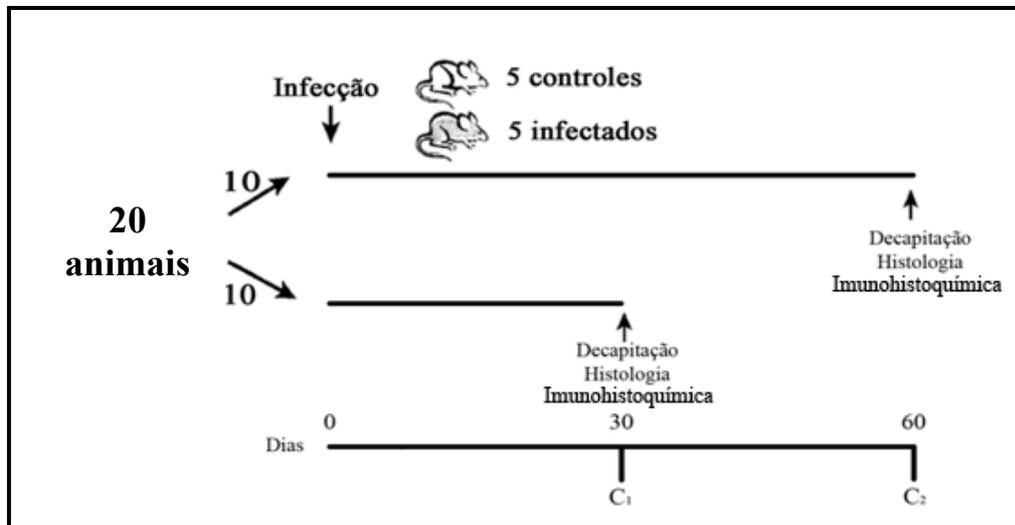


Figura 13: Desenho experimental utilizando modelo de infecção crônica com períodos de infecção C1 e C2, 30 e 60dias, respectivamente.

A inoculação da cepa Me-49 foi realizada no dia 0. Após 30 dias, os animais do grupo C1, foram sacrificados por decapitação e seus cérebros foram congelados imediatamente e armazenados em freezer de ultratemperatura a -80°C . Os cérebros, em seguida, foram seccionados com espessura de $30\mu\text{m}$ em criostato MICROM a temperatura de -20°C . Durante o seccionamento, os cortes foram separados de forma que o intervalo de secção fosse de 1 a cada 5 (Figura 14).



Figura 14: Esquema de disposição das secções nas lâminas.

5.4. Procedimento Experimental

5.4.1. Coloração de Nissl

A coloração de Nissl utiliza o cresil violeta e cora, indistintamente, em violeta núcleos e nucléolos de neurônios e glia. Para preparar a solução de coloração foi preciso aquecer o cresil violeta em água destilada em banho maria a 40°C, agitando-a por 5 minutos; Depois a solução foi filtrada em papel filtro e acrescentado o ácido acético até que o pH da solução estivesse entre 3 e 3,5. As secções nas lâminas foram mergulhadas nas soluções em seqüência, na ordem indicada na tabela abaixo.

Solução	Tempo de imersão
Álcool 100%	5 minutos
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	10 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 75%	3 minutos
Água destilada para lavar	
Cresil violeta	1 – 4 minutos
Água destilada para lavar	
Álcool 80%	3 minutos
Álcool 90%	10 minutos
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	3 minutos
Álcool 95% + ácido acético (15 gotas/100ml)	3 minutos
Álcool 95%	6 minutos
Álcool 100% + ácido butírico (1:1)	3 minutos
Xileno I	5 minutos
Xileno II	5 minutos

Tabela 2: Etapas da reação do método de Nissl.

5.4.2. Histoquímica para NADPH-diaforase

Os cortes de tecido realizados nos cérebros de camundongos foram lavados em tampão TRIS e, em seguida, submetidos à reação histoquímica para revelação da atividade da enzima NADPH-diaforase através do método da enzima málica. Neste método, foi utilizada uma solução contendo 0,03% de azul de nitrotetrazólio (NBT – nitroblue tetrazolium) (Sigma), 1% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma), 0,6% de ácido málico, 0,03% de cloreto de manganês, 0,5% de NADP-b (Sigma) e 3% de Triton X-100 (Sigma) em 50 mL de tampão TRIS 0,1M, pH 8,0. A solução obtida, de coloração amarela, foi então protegida da luz com papel laminado. Os cortes foram incubados sob agitação constante, numa temperatura em torno de 40°C e protegidas da luz. A reação ocorreu em aproximadamente 3 horas, monitorada em intervalos de 30 minutos, utilizando-se microscópio óptico, a fim de evitar que a reação ficasse demasiadamente corada, devido à redução excessiva do azul de nitrotetrazólio em formazan.

A fim de comparar a análise de todos os cortes, haja vista que alguns grupos apresentaram tempos de reação diferentes, foi feita a normalização com um controle interno, ou seja, a adoção de uma escala de medida de densidade referente a uma área coincidente para cada grupo e que não apresentou marcação nenhuma para NADPH-diaforase. Foi analisada a densidade óptica da substância branca em 25 (vinte e cinco) cortes, com medida de $6400\mu\text{m}^2$, já que a mesma não apresenta neurônios NADPH-diaforase positivos, e a média obtida foi comparada entre controle e infectado. Utilizando a seguinte fórmula: $C = (S_n - B) / (S_n + B)$, onde C é o índice de contraste entre a diferença dividido pela soma dos valores de S_n (Substância negra) e B (Substância Branca), proposto por (BORBA, J. M. et al., 2000).

5.4.3. Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase

Para o estudo da imunohistoquímica, os camundongos foram eutanasiados através de decaptação após os períodos de inoculação pré-definidos (C1 e C2). Os cérebros foram removidos e imediatamente congelados em TissueTek utilizando congelamento rápido com gelo seco. Os cérebros foram seccionados, de forma que o intervalo de secção fosse de 1 a cada 5, a 30µm de espessura no criostato em plano coronal e coletadas desde o bulbo até o mesencéfalo. Antes do procedimento imunohistoquímico, as secções foram previamente lavadas e tratadas com peróxido de hidrogênio visando inativar as enzimas peroxidases endógenas. Logo após, as secções do tecido foram incubadas com anticorpo primário anti-TH, proveniente de camundongos, diluídos em PBS (phosphate buffer solution) contendo soro normal a 0,1% (1:10.000; SantaCruz Biotechnology) por toda a noite a temperatura ambiente. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 2X por 10 minutos cada, em tampão fosfato 0,1M, para em seguida serem incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo feito em coelho (1:200, Vector Laboratories, USA) por 2h em temperatura ambiente. Após várias lavagens com PBS 0,1M, o complexo anticorpo foi localizado utilizando uma variação do sistema ABC (Vectastain ABC Elite kit cat # PK6101, Vector Laboratories, USA) seguido pela reação com 3,3'-diaminobenzidine com níquel. As amostras foram então desidratadas em etanol e xileno, para então serem montadas utilizando Entellan.

5.5. Análise dos dados

Foi realizada a contagem de células tirosina hidroxilase positivas e a análise histológica utilizando um microscópio Nikon acoplado a uma câmera digital e a uma base motorizada. Os softwares Stereoinvestigator (MbF Science) e ImageJ (<http://www.nih.gov>) foram utilizados para obtenção e processamento das imagens. A transformação das imagens em escala colorimétrica foi realizada utilizando uma rotina de MatLab v. R2009b ([HTTP://www.mathworks.com](http://www.mathworks.com)). Após a análise das lâminas, os dados obtidos foram analisados com a ajuda do software GraphPad v.5.0, com ANOVA e teste *post-hoc* de Newman Keuls.

6. RESULTADOS

6.1. Controle de peso dos animais;

O controle do peso dos animais foi realizado antes da inoculação de *T.gondii* e após os períodos de inoculação C1 (30dias) e C2 (60 dias). Todos os animais foram mantidos com comida e água *ad libitum*. Os animais foram pesados individualmente, antes da inoculação, após 30 dias e 60 dias depois da inoculação do parasita. O grupo controle (n=3) apresentou um ganho de peso de aproximadamente 46% durante o período experimental. Ao contrário, os grupos infectados (n=3) apresentaram um ganho de peso de aproximadamente 17% e 38% nos grupos de 30 dias e 60 dias, respectivamente (Figura 15).

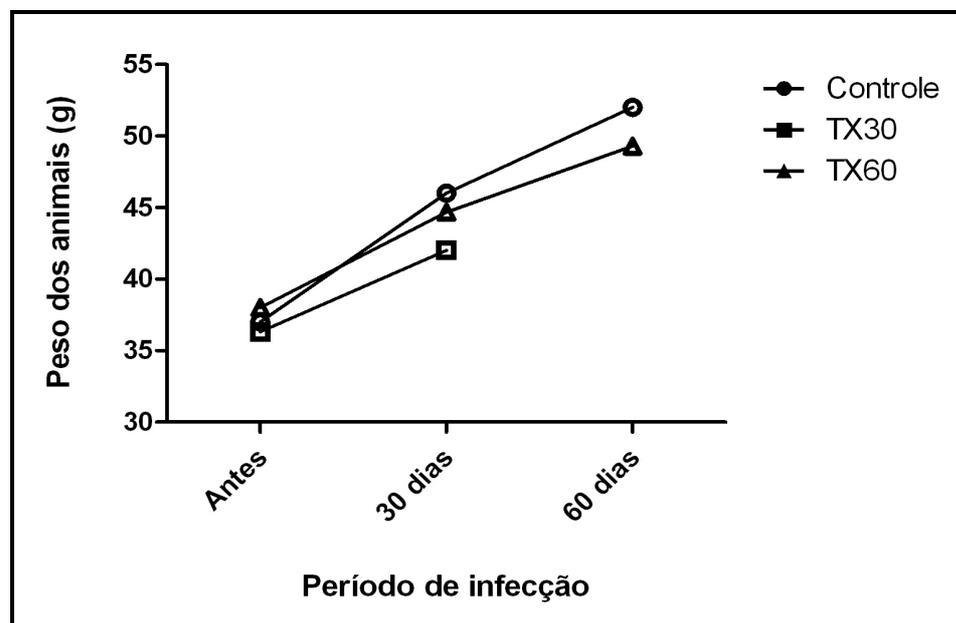


Figura 15: Controle de peso dos animais controle e infectados (Período C1 e C2). Peso em gramas.

Na figura 16, observam-se o contraste entre a aparência macia do pêlo dos camundongos não infectados (Fig. 16A) com a aparência eriçada do pêlo do animal infectado 60 dias antes (Fig.16B).

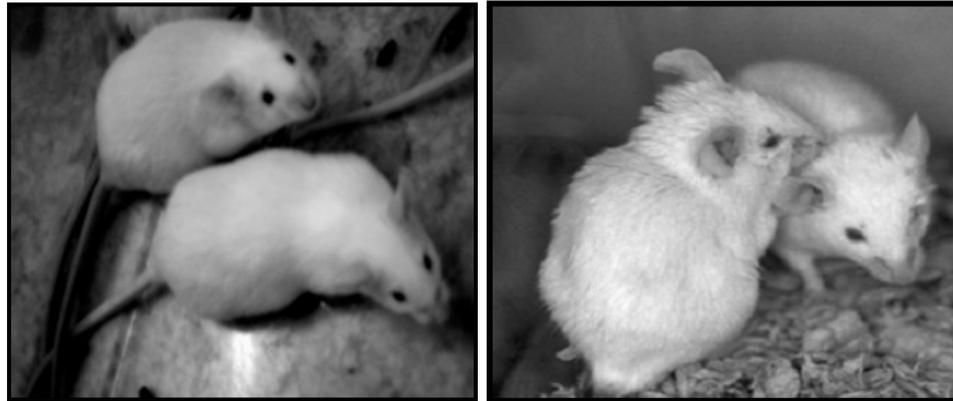


Figura 16: Aparência de camundongos (A) não infectados e (B) infectados com o *Toxoplasma gondii*. (A) Camundongos albinos swiss com 3 meses de idade não infectados pelo *T. gondii*. (B) Camundongos albinos swiss com 3 meses de idade infectados pelo período de 60 dias. Note posição corporal e piloereção.

6.2. Localização do parasita nos animais experimentais;

Os cortes submetidos à imunomarcção para a enzima tirosina hidroxilase também foram analisados, no hemisfério esquerdo, à procura de formas bradizoítas ou taquizoítas, uma vez que o parasita também apresenta a enzima. Cistos do *T. gondii* foram encontrados no parênquima cerebral e em neurônios de regiões como hipocampo, córtex orbito frontal e na substância negra. Na figura 17, pode-se observar um cisto presente no parênquima cerebral próximo à região da substância negra. Cistos contendo bradizoítas foram observados em todos os animais infectados, tanto no período de inoculação de 30 dias quanto no de 60 dias (Dados não mostrados).

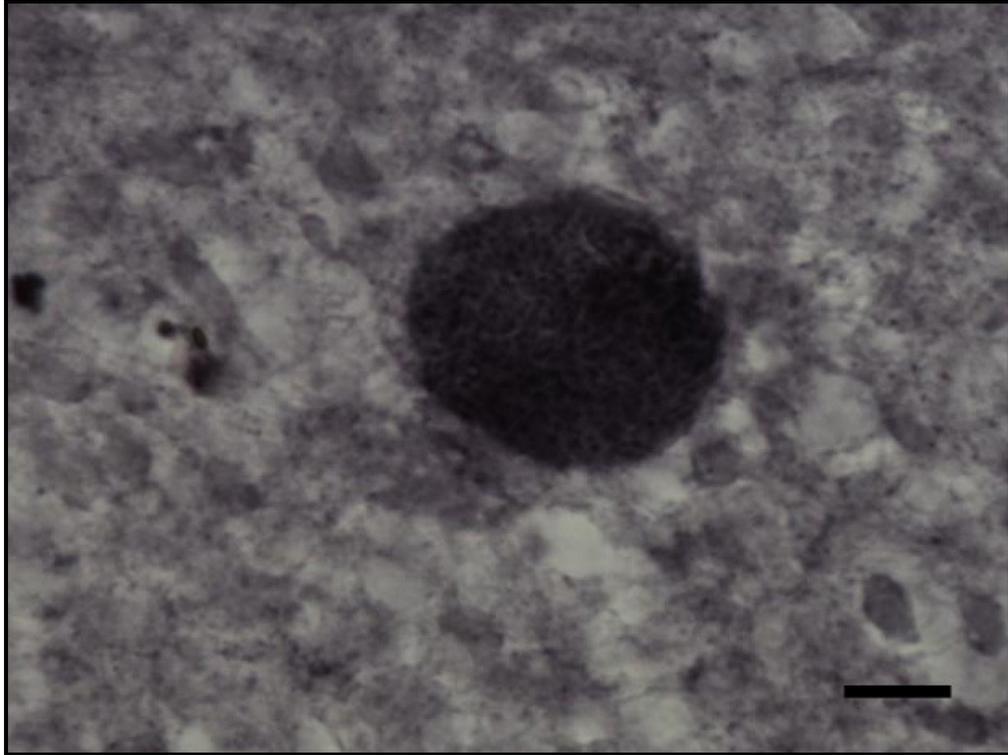


Figura 17: Marcação de cisto, através da imunohistoquímica para tirosina hidroxilase, contendo a forma bradizoíta do *T. gondii* presente no parênquima cerebral próximo à região da substância negra no cérebro de camundongo infectado por 60 dias. Barra de escala=25 μ M.

6.3. Histologia, Imunohistoquímica e Contagem de Células Imunorreativas para Enzima Tirosina Hidroxilase;

A reação imunohistoquímica para a enzima tirosina hidroxilase marca de forma específica os corpos celulares, dendritos proximais e distais e axônios de neurônios dopaminérgicos da substância negra. Estes neurônios positivos para tirosina hidroxilase são fortemente marcados, com corpos celulares de forte coloração e núcleo visível. Nas figuras 18C e 18D observa-se que a intensidade de marcação do grupo infectado (18D) é menor em relação ao grupo controle (18C).

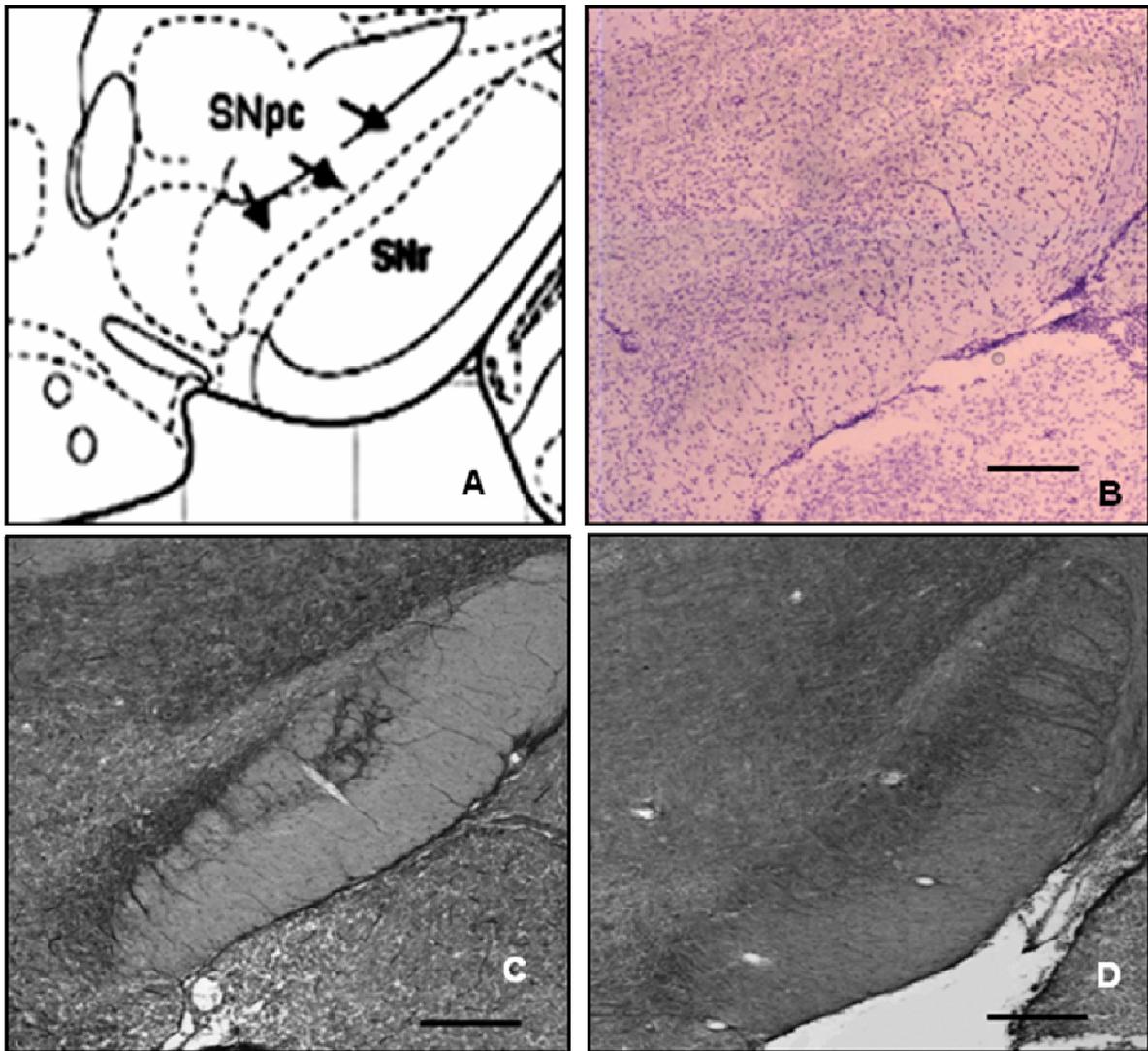


Figura 18: Imunohistoquímica anti-TH na substância negra do cérebro de camundongos controle e infectados. (A) Desenho mostrando a região da substância negra, (B) Fotomicrografia de um corte corado utilizando a técnica de Nissl com a substância negra contornada em vermelho, (C) fotomicrografia de uma secção mostrando os neurônios TH-positivos marcados na substância negra do cérebro de camundongo controle, (D) Fotomicrografia de uma secção mostrando pouca marcação dos neurônios TH-positivos na substância negra do cérebro de camundongo infectado durante 60 dias. Barra de escala=250 μ M.

A contagem de neurônios positivos para a enzima tirosina hidroxilase presentes na substância negra dos animais experimentais demonstrou uma tendência à redução de marcação, embora não ocorra uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. (Figura 19)

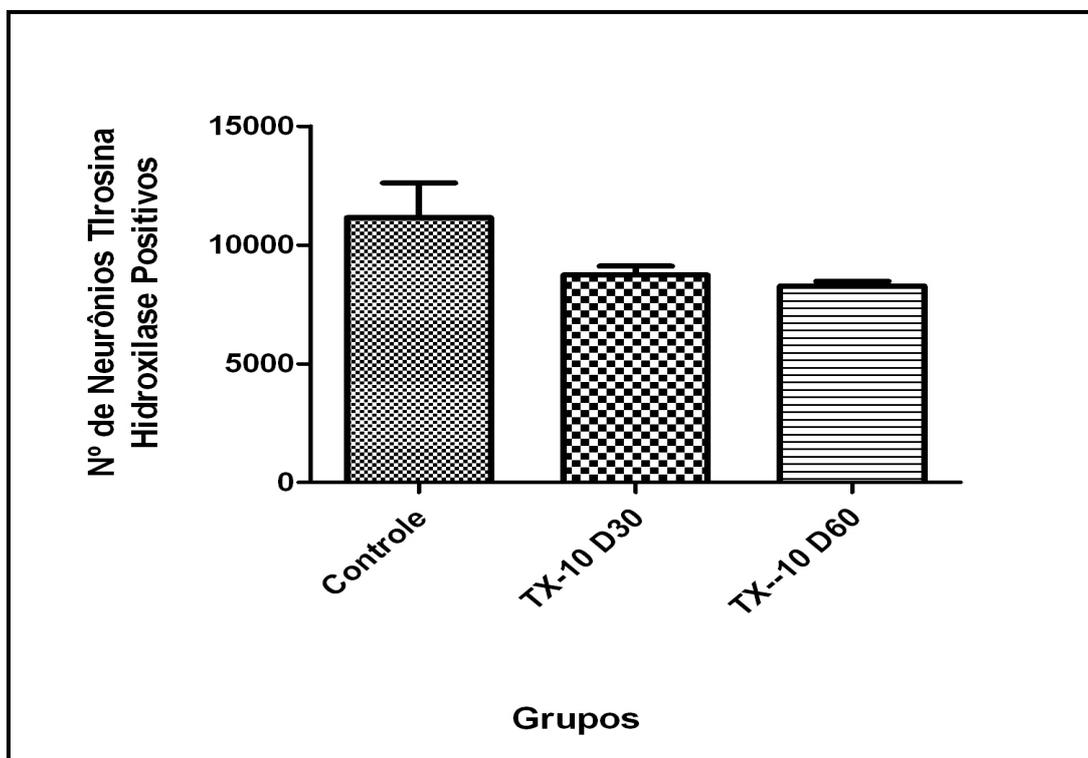


Figura 19: Contagem de neurônios tirosina hidroxilase positivos na substância negra corados por imunohistoquímica para tirosina hidroxilase em camundongos infectados pelo *T. gondii*. Os resultados são mostrados como número de neurônios por substância negra.

6.4. Histoquímica para NADPH-diaforase;

Neurônios marcados para NADPH-diaforase foram observados em todos os cortes analisados (n=5, para cada grupo) ao longo de toda a substância negra do mesencéfalo dos camundongos. Foram analisadas três áreas aleatórias de $6400\mu\text{m}^2$. Todas as células apresentaram um padrão de marcação homogênea, em toda a sua extensão, desde o soma até os dendritos.

A reatividade para a NADPH-diaforase apresentou distribuição homogênea em toda a substância negra, com maior número de neurônios marcados na região *pars compacta* do que na região *pars reticulata*, de acordo com MATSUSHITA e colaboradores (2001). Uma diminuição significativa da reatividade ocorreu na região da substância negra nos animais infectados pelo *Toxoplasma gondii*, que foi confirmada através da análise densitométrica (Figura 22A, B e C).

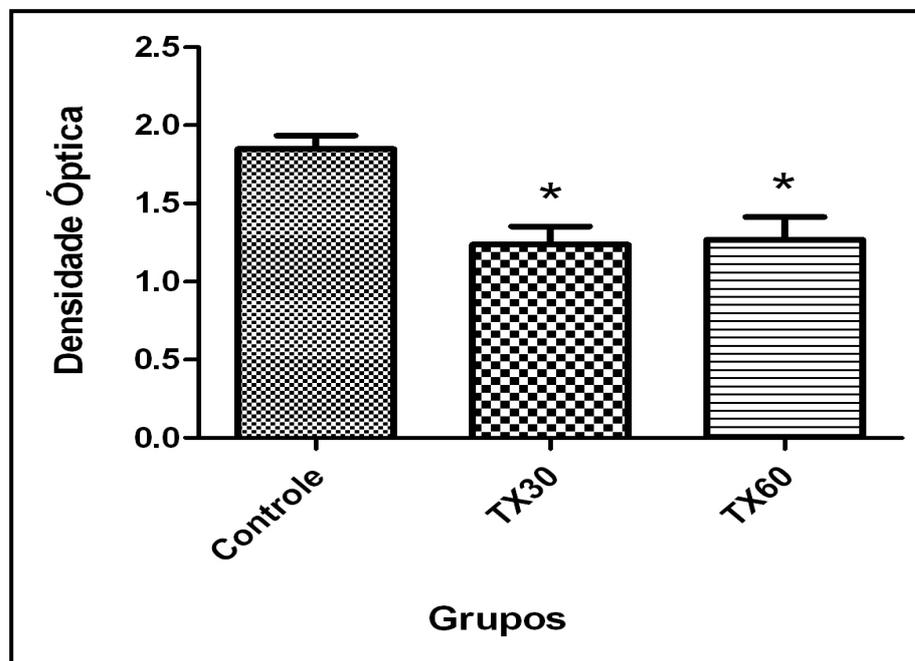


Figura 20: Análise densitométrica da reatividade à NADPH-diaforase na neurópila da região da substância negra de cérebro de camundongos albinos swiss.

A distribuição e a densidade das células NADPH-diaforase positivas nos animais controles estava de acordo com estudos prévios que demonstravam uma distribuição homogênea em toda a região da substância negra, com um número maior de células positivas na região pars compacta do que na reticulada (MATSUSHITA; 2001). O tecido do animal infectado, no entanto, apresentou-se menos reativo à NADPH-diaforase quando comparado ao tecido do animal não-infectado, (Figura 20 e 21), o que foi confirmado na análise densitométrica de cor (Figura 22B e C).

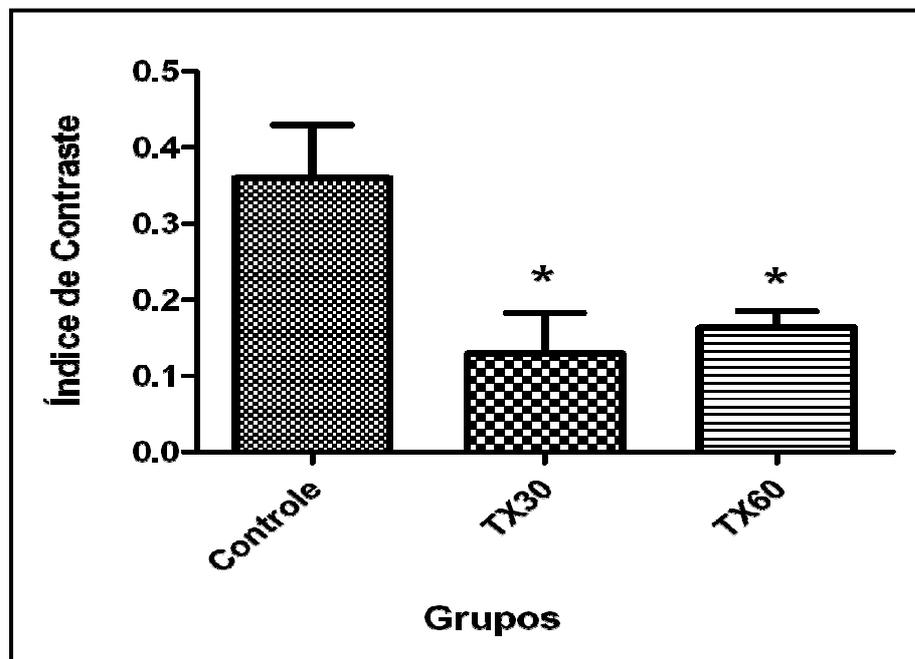


Figura 21: Índice de contraste da neurópila entre os grupos controle e infectado (TX30 e TX60). ($C = (S_n - B)/(S_n + B)$), (* $p < 0.05$).

Com o intuito de estabelecer uma análise comparativa entre os grupos, já que os mesmos não reagiram ao mesmo tempo e sofreram condições experimentais diferentes, foi feita a análise da substância branca, a qual não apresentou células positivas em ambos os grupos. Os resultados na substância negra foram (controle: 0.360 ± 0.1 ; TX30d: 0.130 ± 0.09 ; TX60d: 0.163 ± 0.04) (Figura 21).

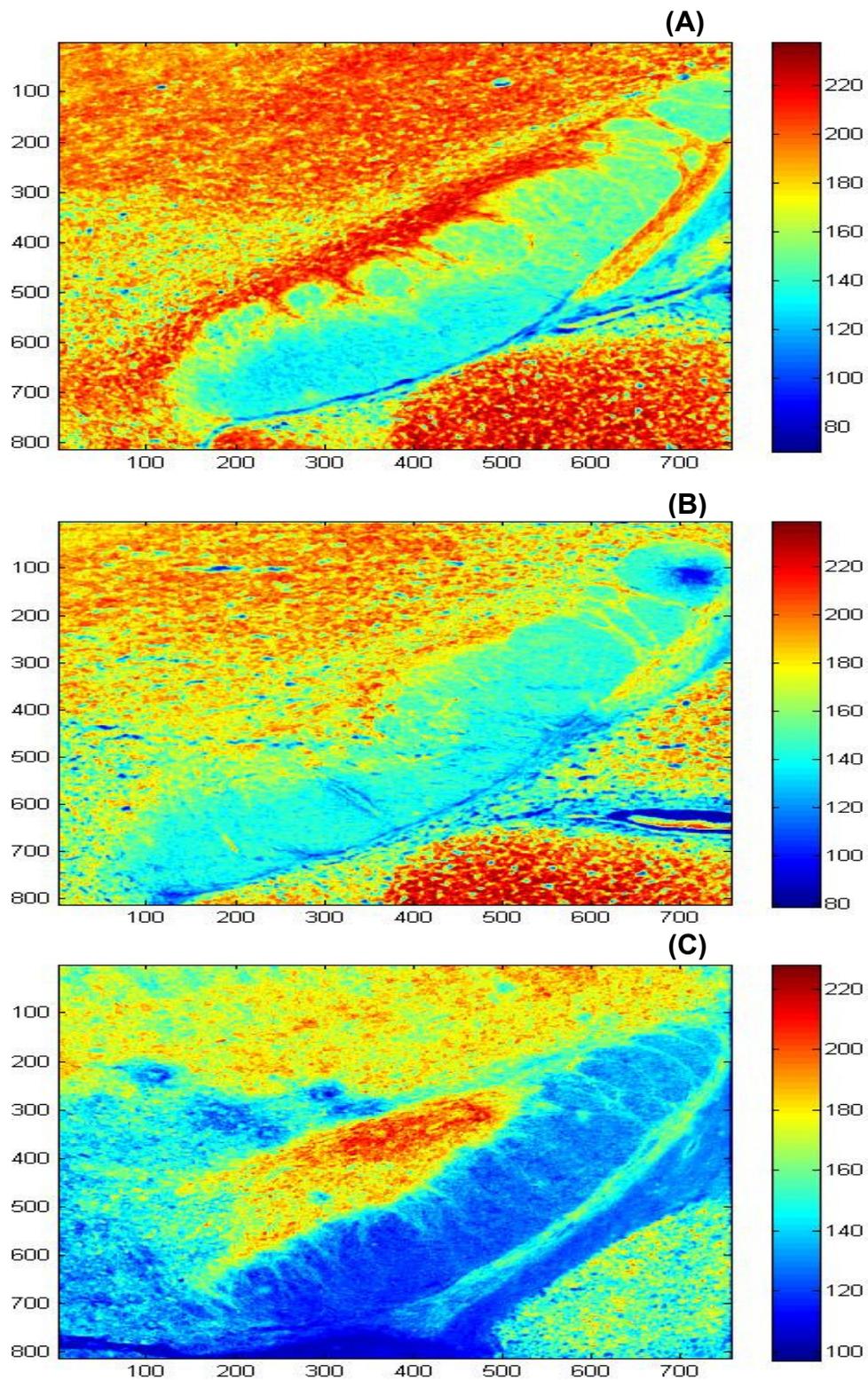


Figura 22: Análise densitométrica das secções marcadas pela histoquímica para NADPH-diaforase mostrando a região da substância negra do cérebro de camundongo controle e infectado. (A) substância negra de camundongo controle, (B) substância negra de camundongo infectado com 10 cistos durante o período C1, (C) substância negra de camundongo infectado com 10 cistos durante o período C2.

7. DISCUSSÃO

A intensidade da infecção pelo *T. gondii* depende da virulência da cepa utilizada, do tipo e tamanho do inóculo e da espécie em que se está analisando os efeitos infecciosos, devendo-se considerar também, o perfil genético e imunológico do hospedeiro (DARCY, F. ; SANTORO, F., 1994).

O parasita *T. gondii* apresenta uma estrutura populacional altamente clonal, que consiste de 3 linhagens predominantes, designadas tipo I, tipo II e tipo III, que ocorrem tanto em animais quanto em humanos. Com relação à correlação entre genótipo do parasito e o hospedeiro, observa-se que a cepa do tipo I é uma cepa muito virulenta e considerada como uma das principais causadoras de doença ocular no País, que a cepa tipo II apresenta maior predominância em casos de toxoplasmose humana e que a freqüência da cepa do tipo III é significativamente mais predominante em animais (HOWE, D. K. ; SIBLEY, L. D., 1995). Embora ainda sejam necessários mais estudos sobre o tipo de cepa dominante no Brasil, é importante avaliar o comportamento de cada tipo a fim de elucidar os mecanismos patofisiológicos de cada uma. Neste trabalho, foi utilizada a cepa Me-49, uma cepa de pouca virulência, que afeta mais comumente humanos e, além disso, causa freqüentemente infecção crônica em animais para consumo humano (HOWE, D. K. ; SIBLEY, L. D., 1995)

Durante o período de infecção utilizado neste estudo, demonstrou-se que esta cepa produz os mesmo efeitos na aparência dos animais experimentais descrito por outros autores (HRDA, S. et al., 2000; SKALLOVA, A. et al., 2006; HERMES, G. et al., 2008), como por exemplo, redução de peso, piloereção, tremor e ferimentos decorrentes de comportamento agressivo.

A redução de ganho de peso nos animais já foi demonstrada por outros autores e relatada como efeito do processo patofisiológico presente no animal. Tal efeito, no entanto, é temporário (HRDA, S. et al., 2000) e ocorre por um período entre oito e dez semanas após a inoculação. Neste estudo, observou-se que durante o período de inoculação o animal apresenta reduzido ganho de peso, possivelmente em decorrência do processo infeccioso, contudo a redução de ganho

de peso passa a ser cada vez menor ao passo em que se aproxima a oitava semana de infecção. Isso demonstra que, embora não tenha sido realizada a sorologia para confirmação do estado imunológico, os animais poderiam estar em processo de soroconversão no período. Este resultado é corroborado pelo estudo de (SKALLOVA, A. et al., 2006), no qual em análise sobre o efeito da infecção no comportamento dos animais observou que durante a primeira semana de infecção os animais reduziam de peso, porém o recuperavam nas semanas seguintes após infecção.

A evidenciação do *T. gondii* no tecido cerebral é rotineira quando se realiza um estudo morfológico no cérebro de animais infectados. Estudos recentes têm demonstrado por bioluminescência a presença do parasito no tecido cerebral e sugerido tropismo para regiões do córtex cerebral, no lobo frontal, e nas regiões do gânglio basal, hipotálamo e cerebelo (DELLACASA-LINDBERG, I.; HITZIGER, N. ; BARRAGAN, A., 2007; VYAS, A. et al., 2007; VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007)

Nos hospedeiros intermediários, os cistos com o *T. gondii* são encontrados principalmente no cérebro (DUBEY, J. P., 1996b; HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S. ; DUBEY, J. P., 2005). Em camundongos, foi observada a presença ou a reativação de cistos teciduais distribuídos ao longo de todo tecido nervoso, com localização preferencial no córtex frontal e parietal, além de infiltração do parasita em áreas basais, como amígdala, hipotálamo, striatum e hipocampo (SHANKAR, S. K. et al., 2005; DELLACASA-LINDBERG, I.; HITZIGER, N. ; BARRAGAN, A., 2007; VYAS, A. et al., 2007; VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007). Em humanos, estudos com a utilização de ressonância magnética demonstram a presença do parasito no lobo frontal e parietal, bem como nos gânglios basais (POST, M. J. et al., 1983; PORTER, S. B. ; SANDE, M. A., 1992; SUZUKI, K. et al., 2010).

No presente trabalho, pode-se observar a presença de cistos teciduais por todo o SNC dos animais infectados, seja no período de 30 dias ou de 60 dias. Além disso, todos os animais apresentavam cistos distribuídos principalmente nas regiões já relacionadas, dentre elas: hipocampo, lobo frontal e substancia negra.

Uma das adaptações mais intrigantes desenvolvidas por alguns parasitas é a capacidade de modular o comportamento do hospedeiro, para facilitar sua própria transmissão de um hospedeiro intermediário para um definitivo (THOMAS, F.; ADAMO, S. ; MOORE, J., 2005). Em modelos animais, por exemplo, já foi demonstrado que o *T. gondii* manipula o comportamento de um dos seus hospedeiros intermediários, o rato, para que aumentem as chances do mesmo ser predado por gatos, onde ocorre a reprodução do parasita (WEBSTER, J. P.; BRUNTON, C. F. ; MACDONALD, D. W., 1994; BERDOY, M.; WEBSTER, J. P. ; MACDONALD, D. W., 1995; SKALLOVA, A. et al., 2006; VYAS, A. et al., 2007; VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007). A presença dos cistos na amígdala, um dos alvos preferenciais do *T. gondii* no cérebro (VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007), e o conseqüente aumento nos níveis de dopamina locais poderia explicar o bloqueio da aversão à urina de felinos em ratos infectados pelo parasita (VYAS, A. et al., 2007; VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007).

Neste contexto, tem se demonstrado que a capacidade de um parasita alterar o comportamento de seus hospedeiros depende de sua capacidade de modular o sistema imunológico ou os sistemas de neurotransmissores dos mesmos, como o sistema dopaminérgico (STIBBS, H. H., 1985; WEBSTER, J. P., 1994; SKALLOVA, A. et al., 2006; VYAS, A. et al., 2007; VYAS, A.; KIM, S. K. ; SAPOLSKY, R. M., 2007; HERMES, G. et al., 2008).

Até o presente momento, no entanto, todos os estudos que avaliaram a relação entre a infecção pelo *T. gondii* com a alteração do comportamento de seus hospedeiros não evidenciaram que tipo de alteração neuroquímica ocorre no cérebro dos seus hospedeiros. Sabe-se que a infecção crônica causada pelo parasita provoca um aumento na concentração de determinados neurotransmissores e diminuição de outros (STIBBS, H. H., 1985; SKALLOVA, A. et al., 2006). Diante disto, o presente estudo demonstra pela primeira vez alterações neuroquímicas em uma determinada região do sistema nervoso dos animais infectados, no caso, na substância negra do mesencéfalo.

A substância negra é um núcleo mesodiencefálico constituído principalmente por neurônios dopaminérgicos. Tais neurônios são de essencial importância para regulação de funções motoras, emocionais e cognitivas. Ainda

que, do ponto de vista quantitativo, constituam somente uma pequena parte dos neurônios cerebrais, os neurônios dopaminérgicos têm uma grande importância funcional (STONE, T. W., 1996).

Além disso, a dopamina não somente participa do sistema de recompensa, como também é importante em processos de tomada de decisão através do controle integrativo de várias áreas cerebrais (SCHULTZ, W.; DAYAN, P. ; MONTAGUE, P. R., 1997).

Baseado nisto, no presente trabalho pode-se observar que a infecção com o protozoário *T. gondii* promoveu uma redução na marcação da enzima tirosina hidroxilase (21% e 25% de redução em relação ao controle, nos animais infectados pelo período de 30 e 60 dias, respectivamente), que converte tirosina em L-DOPA na região da substância negra do cérebro dos camundongos.

A deficiência na produção de dopamina causa disfunção no *Striatum*, o qual por sua vez causa diminuição na atividade da via direta dos neurônios GABAérgicos estriatais para o segmento interno do globo pálido (GPi), e a uma aumento de atividade na via indireta envolvendo o segmento externo de GPi e do núcleo sub-talâmico (HAMANI, C. ; LOZANO, A. M., 2003). Como consequência, a atividade em outras estruturas que recebem inervação são alteradas.

Diante disto, a deficiência na produção de dopamina pode ser encontrada também no sistema límbico e pode resultar em distúrbios psico-patológicos. Além disto, nestes distúrbios estão presentes alterações em outros sistemas de neurotransmissores, como o noradrenérgico subcortical e, o serotoninérgico e colinérgico das vias ascendentes (NORDBERG, A.; NYBERG, P. ; WINDBLAD, B., 1985; JELLINGER, K. A., 1997; 1999; PATERSON, D. ; NORDBERG, A., 2000). Por exemplo, alterações em neurônios colinérgicos podem contribuir para o surgimento de demência, além de que a perda de receptores colinérgicos corticais são positivamente correlacionados com o grau de déficits cognitivos (PATERSON, D. ; NORDBERG, A., 2000; QUIK, M. ; JEYARASASINGAM, G., 2000).

Recentemente, demonstrou-se que o genoma do *T. gondii* contém dois genes muito semelhantes aos que codificam a tirosina hidroxilase em humanos

(GASKELL, E. A. et al., 2009). Esta enzima participa na conversão da tirosina em L-DOPA e é o passo limitante da reação de síntese deste aminoácido. A L-DOPA é o precursor do neurotransmissor dopamina. As enzimas codificadas pelos genes do parasita produzem L-DOPA e utilizam como substrato a fenilalanina e a tirosina, com preferência por esta última, convertendo a fenilalanina em tirosina e a tirosina em L-DOPA (GASKELL, E. A. et al., 2009).

Neste contexto, as alterações observadas no presente trabalho, podem ter ocorrido devido a modulações em mecanismos compensatórios que incluem propriedades intrínsecas dos neurônios dopaminérgicos nigro-estriais, auto-regulação da concentração de receptores dopaminérgicos, alterações na transmissão da dopamina para o *striatum* e em modificações neuroquímicas nas fibras de entrada na substância negra (BEZARD, E. ; GROSS, C. E., 1998; MOORE, R. Y., 2003).

Outro fator importante, é que as modificações observadas no trabalho podem ter sido ocasionadas por alterações na disponibilidade de tirosina, uma vez que dada a utilização da tirosina pelo parasita, a falta desta pode modular a atividade da tirosina hidroxilase. Além disso, o próprio parasita pode estar liberando esta dopamina e esta provocando um feedback negativo para a síntese de dopamina através da ativação de receptores dopaminérgicos pré-sinápticos. Ainda é importante destacar que a liberação da dopamina presente nas vesículas intracelulares é um processo dependente de cálcio (COOPER, J. R.; BLOOM, F. E. ; ROTH, R. H., 2003), e neste caso, o parasita também pode estar alterando este processo, haja vista que ele utiliza o cálcio para seu próprio metabolismo, invasão, egresso, proliferação, diferenciação, exocitose de proteínas e motilidade do parasita (LOVETT, J. L. ; SIBLEY, L. D., 2003; ARRIZABALAGA, G. ; BOOTHROYD, J. C., 2004; LOURIDO, S. et al., 2010).

Alterações na síntese, liberação ou recaptação de neurotransmissores, induzidas pelo parasita *T. gondii*, podem, conseqüentemente, ser o fator responsável por prejuízos motores e cognitivos nos seus hospedeiros, e possivelmente o mecanismo pelo qual provoca distúrbios neurológicos, como esquizofrenia, Doença de Parkinson, déficit de atenção e hiperatividade, as quais têm em comum a disfunção do sistema dopaminérgico.

Além disso, é importante ressaltar que as alterações que ocorrem nos neurônios dopaminérgicos na substância negra podem afetar circunstancialmente regiões corticais e sub-corticais, haja vista a maciça presença de “loops” entre as mesmas.

Ainda não foi elucidado se o parasita produz dopamina para si, se a libera no citoplasma ou parênquima cerebral do hospedeiro. De modo interessante, foi mostrado que uma das cópias do gene é expressa constitutivamente durante o ciclo de vida do parasita, o que sugere que ele utilize L-DOPA para seu próprio metabolismo, enquanto a expressão do outro gene é induzida durante a fase bradizoíta, de formação de cistos no cérebro e músculos (GASKELL, E. A. et al., 2009), que sugere por sua vez que a L-DOPA produzida seja liberada na célula do hospedeiro. Este fato corrobora e fortalece a idéia de que as mudanças comportamentais observadas em animais experimentais estejam fortemente relacionadas à presença e modulação dos circuitos neuronais pelo próprio parasita (STIBBS, H. H., 1985; FLEGR, J. et al., 2003).

Histologicamente, analisando a substância negra, utilizando a marcação para a enzima tirosina hidroxilase, haja vista que o parasita apresenta a enzima, foi possível localizar cistos do *T. gondii* no parênquima cerebral e em neurônios localizado no córtex orbito-frontal, hipocampo e substância negra.

É importante, além de verificar os efeitos sobre a dopamina, tentar entender o mecanismo patofisiológico da infecção latente como um todo, avaliando outros neurotransmissores e neuromoduladores. Alguns fatores envolvidos na patofisiologia da infecção cerebral pelo *T. gondii* vem sendo demonstrada em modelos animais. Estes modelos abordam principalmente os mecanismos imunológicos de controle da infecção no tecido nervoso, como a participação de citocinas e quimiocinas, além da participação de células nervosas nesse rígido controle, através da liberação de mediadores imunológicos como o INF- γ , TNF- α e ON (LUDER, C. G. et al., 1999; SUZUKI, Y. et al., 2000; WILSON, E. H. ; HUNTER, C. A., 2004) Contudo ainda são raros os estudos sobre a relação de fatores imunológicos com a sinalização celular para liberação de neurotransmissores no tecido cerebral.

Muitos estudos demonstram a participação do ON na regulação de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, sugerindo uma modulação nas vias corticais e subcorticais por este neurotransmissor. Esta modulação pode resultar em disfunção na sinalização glutamatérgica, gabaérgica e dopaminérgica em regiões que recebem projeções da substância negra (WEST, A. R. ; GRACE, A. A., 2000).

Neste processo, a diminuição da expressão de ON, como visto neste trabalho, pode acarretar em efeitos sobre o sistema neurotransmissor das células localizadas em regiões como o estriado ou a substância negra, podendo induzir ao aparecimento de distúrbios neurológicos. Estudos demonstraram uma diminuição no número de interneurônios nitrérgicos no estriado de pacientes com esquizofrenia. Esta diminuição pode ser responsável por alterar o controle glutamatérgico sobre as fibras eferentes dopaminérgicas na substância negra, contribuindo para a etiopatologia desta psicose (FRITZEN, S. et al., 2007).

Desta forma, neste estudo a análise indireta da presença do ON através da histoquímica para NADPH-diaforase em camundongos infectados, na região da substância negra, maciçamente interconectada com inúmeras estruturas corticais e subcorticais, revela que a infecção latente pelo *T. gondii* afeta a distribuição deste marcador fisiológico, diminuindo a expressão de células intensamente marcadas na região da substância negra, com uma difusa distribuição em áreas adjacentes. Esta alteração pode futuramente revelar diferenças quantitativas na liberação de outros neurotransmissores importantes para a regulação dopaminérgica, como a regulação promovida pelo GABA, tanto na substância negra quanto no outro núcleo de células dopaminérgicas que fica na área tegmentar ventral.

8. CONCLUSÃO

- O parasita *Toxoplasma gondii* interfere no sistema dopaminérgico na região da substância negra reduzindo a expressão da enzima tirosina hidroxilase;
- Esta modulação pode depender de outros neurotransmissores como ON e GABA.
- Durante a fase latente, ocorre uma modulação negativa da ONS na substância negra.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRIZABALAGA, G.; BOOTHROYD, J. C. **Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress.** Int J Parasitol. v.34, n.3, p.361-8. Mar 9. 2004.

ASPOCK, H. et al. **[Toxoplasmosis. Recommendations for treatment of primary toxoplasma infection in pregnancy and congenital toxoplasmosis].** Gynakol Geburtshilfliche Rundsch. v.34, n.1, p.50-1. 1994.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. **Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence.** J Exp Med. v.195, n.12, p.1625-33. Jun 17. 2002.

BARSOUM, R. S. **Parasitic infections in transplant recipients.** Nat Clin Pract Nephrol. v.2, n.9, p.490-503. Sep. 2006.

BECK, H.-P. et al. **Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites.** International Journal for Parasitology. v.39, n.2, p.175-189. 2009.

BERDOY, M.; WEBSTER, J. P.; MACDONALD, D. W. **Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*.** Proc Biol Sci. v.267, n.1452, p.1591-4. Aug 7. 2000.

_____. **Parasite-altered behaviour: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific?** Parasitology. v.111 (Pt 4), p.403-9. Nov. 1995.

BEZARD, E.; GROSS, C. E. **Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach.** Prog Neurobiol. v.55, n.2, p.93-116. Jun. 1998.

BONAMETTI, A. M. et al. **Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding.** J Trop Pediatr. v.43, n.2, p.116. Apr. 1997.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. **Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?** Curr Opin Microbiol. v.5, n.4, p.438-42. Aug. 2002.

BORBA, J. M. et al. **Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition.** Brain Res Bull. v.53, n.2, p.193-201. Sep 15. 2000.

CHO, J. Y. et al. **Rapid down-regulation of tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb of naris-occluded adult rats.** J Comp Neurol. v.369, n.2, p.264-76. May 27. 1996.

COBB, W. S.; ABERCROMBIE, E. D. **Distinct roles for nigral GABA and glutamate receptors in the regulation of dendritic dopamine release under normal conditions and in response to systemic haloperidol.** J Neurosci. v.22, n.4, p.1407-13. Feb 15. 2002.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. (Org.). **The biochemical basis of neuropharmacology.** 8th.ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2003.

DAHLSTROEM, A.; FUXE, K. **Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons.** Acta Physiol Scand Suppl, p.SUPPL 232:1-55. 1964.

DARCY, F.; SANTORO, F. KIERSZENBAUM, F. (Org.). **Toxoplasmosis.** San Diego: Academic Press, Inc., 1994.

DAWSON, T. M. et al. **Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues.** Proc Natl Acad Sci U S A. v.88, n.17, p.7797-801. Sep 1. 1991.

DAWSON, V. L. et al. **Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures.** J Neurosci. v.13, n.6, p.2651-61. Jun. 1993.

DELLACASA-LINDBERG, I.; HITZIGER, N.; BARRAGAN, A. **Localized recrudescence of Toxoplasma infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging.** Microbes Infect. v.9, n.11, p.1291-8. Sep. 2007.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. **Prevention of toxoplasmosis in transplant patients.** Clin Microbiol Infect. v.14, n.12, p.1089-101. Dec. 2008.

DI CHIARA, G. **Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction.** Behav Brain Res. v.137, n.1-2, p.75-114. Dec 2. 2002.

DUBEY, J. P. **Infectivity and pathogenicity of Toxoplasma gondii oocysts for cats.** J Parasitol. v.82, n.6, p.957-61. Dec. 1996a.

_____. **Pathogenicity and infectivity of Toxoplasma gondii oocysts for rats.** J Parasitol. v.82, n.6, p.951-6. Dec. 1996b.

DUBEY, J. P. et al. **Fatal toxoplasmosis and enteroepithelial stages of Toxoplasma gondii in a Pallas cat (Felis manul).** J Protozool. v.35, n.4, p.528-30. Nov. 1988.

_____. **Effect of high temperature on infectivity of Toxoplasma gondii tissue cysts in pork.** J Parasitol. v.76, n.2, p.201-4. Apr. 1990.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. **Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.** Clin Microbiol Rev. v.11, n.2, p.267-99. Apr. 1998.

DUBREMETZ, J. F. **Host cell invasion by *Toxoplasma gondii***. Trends Microbiol. v.6, n.1, p.27-30. Jan. 1998.

_____. **Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction**. Cell Microbiol. v.9, n.4, p.841-8. Apr. 2007.

DUBREMETZ, J. F. et al. **Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa**. Int J Parasitol. v.28, n.7, p.1007-13. Jul. 1998.

ERHARDT, S. et al. **GABA(B) receptor-mediated modulation of the firing pattern of ventral tegmental area dopamine neurons in vivo**. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. v.365, n.3, p.173-80. Mar. 2002.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. (Org.). **Principles of neuropsychopharmacology**. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1997.

FERGUSON, D. J. ***Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra?** Trends Parasitol. v.18, n.8, p.355-9. Aug. 2002.

FLEGR, J. **Effects of toxoplasma on human behavior**. Schizophr Bull. v.33, n.3, p.757-60. May. 2007.

_____. **Influence of latent toxoplasmosis on the phenotype of intermediate hosts**. Folia Parasitol (Praha). v.57, n.2, p.81-7. Jun. 2010.

FLEGR, J.; KODYM, P.; TOLAROVA, V. **Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii* infection with personality changes in women**. Biol Psychol. v.53, n.1, p.57-68. May. 2000.

FLEGR, J. et al. **Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* Dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis?** Biol Psychol. v.63, n.3, p.253-68. Jul. 2003.

_____. **Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii***. Parasitology. v.113 (Pt 1), p.49-54. Jul. 1996.

FREIRE, M. A. et al. **Differential effects of methylmercury intoxication in the rat's barrel field as evidenced by NADPH diaphorase histochemistry**. Neurotoxicology. v.28, n.1, p.175-81. Jan. 2007.

FRENKEL, J. K. **The stage-conversion time of *Toxoplasma gondii*: interpretation of chemical-biologic data out of parasitologic or host context**. Parasitol Res. v.82, n.7, p.656-8. 1996.

FRIESE, K.; WEIGEL, M.; MELCHERT, F. **[Diagnosis and therapy of congenital toxoplasmosis]**. Geburtshilfe Frauenheilkd. v.54, n.8, p.M99-101. Aug. 1994.

FRITZEN, S. et al. **NO synthase-positive striatal interneurons are decreased in schizophrenia.** Eur Neuropsychopharmacol. v.17, n.9, p.595-9. Sep. 2007.

GASKELL, E. A. et al. **A unique dual activity amino acid hydroxylase in Toxoplasma gondii.** PLoS One. v.4, n.3, p.e4801. 2009.

GERDEMAN, G. L. et al. **It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity.** Trends in Neurosciences. v.26, n.4, p.184-192. 2003.

GIORGUIEFF, M. F.; KEMEL, M. L.; GLOWINSKI, J. **Presynaptic effect of L-glutamic acid on the release of dopamine in rat striatal slices.** Neurosci Lett. v.6, n.1, p.73-7. Oct. 1977.

GRAYBIEL, A. M. **The basal ganglia and chunking of action repertoires.** Neurobiol Learn Mem. v.70, n.1-2, p.119-36. Jul-Sep. 1998.

_____. **Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia.** Trends Neurosci. v.13, n.7, p.244-54. Jul. 1990.

HAMANI, C.; LOZANO, A. M. **Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease.** Ann N Y Acad Sci. v.991, p.15-21. Jun. 2003.

HAVLICEK, J. et al. **Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis.** Parasitology. v.122, n.Pt 5, p.515-20. May. 2001.

HAY, J. et al. **The effect of congenital and adult-acquired Toxoplasma infections on activity and responsiveness to novel stimulation in mice.** Ann Trop Med Parasitol. v.77, n.5, p.483-95. Oct. 1983.

HERMES, G. et al. **Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection.** J Neuroinflammation. v.5, p.48. 2008.

HILL, D.; DUBEY, J. P. **Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention.** Clin Microbiol Infect. v.8, n.10, p.634-40. Oct. 2002.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. **Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals.** Anim Health Res Rev. v.6, n.1, p.41-61. Jun. 2005.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. **Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease.** J Infect Dis. v.172, n.6, p.1561-6. Dec. 1995.

HRDA, S. et al. **Transient nature of Toxoplasma gondii-induced behavioral changes in mice.** J Parasitol. v.86, n.4, p.657-63. Aug. 2000.

HUTCHISON, W. M.; AITKEN, P. P.; WELLS, B. W. **Chronic Toxoplasma infections and motor performance in the mouse.** Ann Trop Med Parasitol. v.74, n.5, p.507-10. Oct. 1980.

JELLINGER, K. A. **Morphological substrates of dementia in parkinsonism. A critical update.** J Neural Transm Suppl. v.51, p.57-82. 1997.

_____. **Post mortem studies in Parkinson's disease--is it possible to detect brain areas for specific symptoms?** J Neural Transm Suppl. v.56, p.1-29. 1999.

KABBAJ, M.; AKIL, H. **Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study.** Neuroscience. v.106, n.3, p.535-45. 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (Org.). **Principles of neural science.** 4th.ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000.

KANNAN, G. et al. **Toxoplasma gondii strain-dependent effects on mouse behaviour.** Folia Parasitol (Praha). v.57, n.2, p.151-5. Jun. 2010.

KRAUS, M. M.; PRAST, H. **Involvement of nitric oxide, cyclic GMP and phosphodiesterase 5 in excitatory amino acid and GABA release in the nucleus accumbens evoked by activation of the hippocampal fimbria.** Neuroscience. v.112, n.2, p.331-43. 2002.

LI, D. P.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. **Nitric oxide inhibits spinally projecting paraventricular neurons through potentiation of presynaptic GABA release.** J Neurophysiol. v.88, n.5, p.2664-74. Nov. 2002.

LOURIDO, S. et al. **Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in Toxoplasma.** Nature. v.465, n.7296, p.359-62. May 20. 2010.

LOVETT, J. L.; SIBLEY, L. D. **Intracellular calcium stores in Toxoplasma gondii govern invasion of host cells.** J Cell Sci. v.116, n.Pt 14, p.3009-16. Jul 15. 2003.

LUDER, C. G. et al. **Toxoplasma gondii in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation.** Exp Parasitol. v.93, n.1, p.23-32. Sep. 1999.

MCCAULEY, A. K.; CARDEN, W. B.; GODWIN, D. W. **Brain nitric oxide synthase expression in the developing ferret lateral geniculate nucleus: analysis of time course, localization, and synaptic contacts.** J Comp Neurol. v.462, n.3, p.342-54. Jun 9. 2003.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. **Toxoplasmosis.** Lancet. v.363, n.9425, p.1965-76. Jun 12. 2004.

MOORE, R. Y. **Organization of midbrain dopamine systems and the pathophysiology of Parkinson's disease.** Parkinsonism Relat Disord. v.9 Suppl 2, p.S65-71. Aug. 2003.

MORDUE, D. G. et al. **Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring.** J Exp Med. v.190, n.12, p.1783-92. Dec 20. 1999a.

_____. ***Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways.** Exp Parasitol. v.92, n.2, p.87-99. Jun. 1999b.

NAQI, R.; AZEEMUDDIN, M.; AHSAN, H. **Cerebral toxoplasmosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.** J Pak Med Assoc. v.60, n.4, p.316-8. Apr. 2010.

NEDERGAARD, O. A. **Catecholamines: regulation, release and inactivation.** Pharmacol Toxicol. v.63 Suppl 1, p.5-8. 1988.

NEU, H. C. **Toxoplasmosis transmitted at autopsy.** JAMA. v.202, n.8, p.844-5. Nov 20. 1967.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. **Sur un protozoaire nouveau du gondi. (*Toxoplasma N. Gen.*)**. Archives de L'Institut Pasteur de Tunis. v.1. 1908.

NIEOULLON, A. **Dopamine and the regulation of cognition and attention.** Prog Neurobiol. v.67, n.1, p.53-83. May. 2002.

NORDBERG, A.; NYBERG, P.; WINDBLAD, B. **Topographic distribution of choline acetyltransferase activity and muscarinic and nicotinic receptors in Parkinson brains.** Neurochem Pathol. v.3, n.4, p.223-36. Winter. 1985.

PARENT, A. **Extrinsic connections of the basal ganglia.** Trends Neurosci. v.13, n.7, p.254-8. Jul. 1990.

PATERSON, D.; NORDBERG, A. **Neuronal nicotinic receptors in the human brain.** Prog Neurobiol. v.61, n.1, p.75-111. May. 2000.

PORTER, S. B.; SANDE, M. A. **Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome.** N Engl J Med. v.327, n.23, p.1643-8. Dec 3. 1992.

POST, M. J. et al. ***Toxoplasma* encephalitis in Haitian adults with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical-pathologic-CT correlation.** AJR Am J Roentgenol. v.140, n.5, p.861-8. May. 1983.

QUIK, M.; JEYARASASINGAM, G. **Nicotinic receptors and Parkinson's disease.** Eur J Pharmacol. v.393, n.1-3, p.223-30. Mar 30. 2000.

RAUHALA, P.; ANDOH, T.; CHIUEH, C. C. **Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione.** Toxicol Appl Pharmacol. v.207, n.2 Suppl, p.91-5. Sep 1. 2005.

ROBERTS, L. S.; SCHMIDT, G. D.; JANOBY, J. ROBERTS, L. S.; G. D. SCHMIDT; J. JANOBY (Org.). **Foundations of parasitology**. 8th.ed. Boston: McGraw-Hill Higher Education, 2009.

SAFFER, L. D. et al. **Localization of a Toxoplasma gondii rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration**. J Protozool. v.39, n.4, p.526-30. Jul-Aug. 1992.

SCHULTZ, W.; DAYAN, P.; MONTAGUE, P. R. **A neural substrate of prediction and reward**. Science. v.275, n.5306, p.1593-9. Mar 14. 1997.

SHANKAR, S. K. et al. **Neuropathology of HIV/AIDS with an overview of the Indian scene**. Indian J Med Res. v.121, n.4, p.468-88. Apr. 2005.

SINAI, A. P.; JOINER, K. A. **Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles**. Annu Rev Microbiol. v.51, p.415-62. 1997.

SINAI, A. P.; WEBSTER, P.; JOINER, K. A. **Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction**. J Cell Sci. v.110 (Pt 17), p.2117-28. Sep. 1997.

SKALLOVA, A. et al. **The role of dopamine in Toxoplasma-induced behavioural alterations in mice: an ethological and ethopharmacological study**. Parasitology. v.133, n.Pt 5, p.525-35. Nov. 2006.

SPLENDRE, A. **Sopra un nuovo protozoo parassita de' conigli**. Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo, p.10-12. 1908.

STEINBROOK, R.; DRAZEN, J. M. **AIDS--will the next 20 years be different?** N Engl J Med. v.344, n.23, p.1781-2. Jun 7. 2001.

STIBBS, H. H. **Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in Toxoplasma gondii infected mice**. Ann Trop Med Parasitol. v.79, n.2, p.153-7. Apr. 1985.

STONE, T. W. (Org.). **CNS neurotransmitters and neuromodulators : dopamine**. Boca Raton: CRC Press, 1996.

SUZUKI, K. et al. **High-intensity signals in the basal ganglia from gadolinium-enhanced T1-weighted MRI as an early change in toxoplasma encephalitis in an AIDS patient**. J Infect Chemother. v.16, n.2, p.135-8. Apr. 2010.

SUZUKI, Y. et al. **Induction of tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase fails to prevent toxoplasmic encephalitis in the absence of interferon-gamma in genetically resistant BALB/c mice**. Microbes Infect. v.2, n.5, p.455-62. Apr. 2000.

- SWISHER, C. N.; BOYER, K.; MCLEOD, R. **Congenital toxoplasmosis. The Toxoplasmosis Study Group.** Semin Pediatr Neurol. v.1, n.1, p.4-25. Sep. 1994.
- SZABO, C. **Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system.** Brain Res Bull. v.41, n.3, p.131-41. 1996.
- THOMAS, F.; ADAMO, S.; MOORE, J. **Parasitic manipulation: where are we and where should we go?** Behav Processes. v.68, n.3, p.185-99. Mar 31. 2005.
- VALAR, C. et al. **Parasitic infection in renal transplant recipients.** Transplant Proc. v.39, n.2, p.460-2. Mar. 2007.
- VOGEL, N. et al. **Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception.** Clin Infect Dis. v.23, n.5, p.1055-60. Nov. 1996.
- VYAS, A. et al. **Behavioral changes induced by Toxoplasma infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors.** Proc Natl Acad Sci U S A. v.104, n.15, p.6442-7. Apr 10. 2007.
- VYAS, A.; KIM, S. K.; SAPOLSKY, R. M. **The effects of toxoplasma infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus.** Neuroscience. v.148, n.2, p.342-8. Aug 24. 2007.
- WEBSTER, J. P. **The effect of Toxoplasma gondii and other parasites on activity levels in wild and hybrid Rattus norvegicus.** Parasitology. v.109 (Pt 5), p.583-9. Dec. 1994.
- WEBSTER, J. P.; BRUNTON, C. F.; MACDONALD, D. W. **Effect of Toxoplasma gondii upon neophobic behaviour in wild brown rats, Rattus norvegicus.** Parasitology. v.109 (Pt 1), p.37-43. Jul. 1994.
- WEBSTER, J. P. et al. **Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on Toxoplasma gondii's ability to alter host behaviour.** Proc Biol Sci. v.273, n.1589, p.1023-30. Apr 22. 2006.
- WEBSTER, J. P.; MCCONKEY, G. A. **Toxoplasma gondii-altered host behaviour: clues as to mechanism of action.** Folia Parasitol (Praha). v.57, n.2, p.95-104. Jun. 2010.
- WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis: A history of clinical observations.** Int J Parasitol. v.39, n.8, p.895-901. Jul 1. 2009.
- WEST, A. R.; GRACE, A. A. **Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo.** J Neurophysiol. v.83, n.4, p.1796-808. Apr. 2000.

WILSON, E. H.; HUNTER, C. A. **The role of astrocytes in the immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis.** Int J Parasitol. v.34, n.5, p.543-8. Apr. 2004.

WITTING, P. A. **Learning capacity and memory of normal and Toxoplasma-infected laboratory rats and mice.** Z Parasitenkd. v.61, n.1, p.29-51. 1979.

YANG, S.; COX, C. L. **Modulation of inhibitory activity by nitric oxide in the thalamus.** J Neurophysiol. v.97, n.5, p.3386-95. May. 2007.