Sergio Vieira dos Santos

Infecção concomitante experimental de *Rattus norvegicus* por *Toxocara canis* e *Toxoplasma gondii*: estudo comportamental e histopatológico

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi
Co-orientador: Prof. Dr. Hudson de Sousa Buck

São Paulo
2016

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

Santos, Sergio Vieira dos
Infecção concomitante experimental de *Rattus norvegicus* por *Toxacara canis* e *Toxoplasma gondii*: estudo comportamental e histopatológico / Sergio Vieira dos Santos. – São Paulo, 2016.
Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Pedro Paulo Chieffi

Descritores: 1. TOXOCARÍASE. 2. TOXOPLASMOSE. 3. COMPORTAMENTO ANIMAL. 4. RATO.

USP/IMTSP/BIB-04/2016.

Dedico este trabalho

Aos meus pais Aluizio dos Santos "*in memoriam"* e Aparecida Vieira dos Santos, pelo carinho, dedicação e exemplo de coragem que foram fundamentais para minha formação.

Aos meus amigos João Manoel de Castro, Carmelita Rodrigues e Maria Auxiliadora Keller, pessoas que sempre estiveram ao meu lado nos momentos tristes e felizes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi pela paciência, incentivo e sabedoria, com quem muito aprendi;

Ao co-orientador Prof. Dr. Hudson de Sousa Buck pela orientação na parte comportamental dos animais;

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo nas pessoas de seus professores e funcionários, que possibilitaram ampliar meus conhecimentos;

À secretária do curso de Pós-Graduação Eliane Araujo pela paciência, atenção e dedicação durante estes cinco anos de convivência.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida;

À Dra. Ariadny de Lima Caetano e à MSc. Ticiani, Biotécnicas do Depto. de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo, por terem me acompanhado em todos os procedimentos comportamentais e na técnica de retirada dos cérebros dos ratos;

À Dra. Karen, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, por ter me acompanhado no procedimento com os animais no Labirinto de Barnes e nas técnicas de coloração;

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos/SP na pessoa da funcionária Renata que me auxiliou na coleta dos vermes adultos de *Toxocara canis.*

À Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano do Laboratório de Helmintologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela acolhida amigável e colaboração incessante no desenvolvimento do trabalho.

Aos técnicos Daniel Maurício dos Santos e Érico Silva Tiago da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, que me auxiliaram nos cortes histológicos dos cérebros dos ratos, nas colorações e cuidado com os animais durante o período em que permaneceram no Biotério da Santa Casa.

Ao Bibliotecário Carlos José Quinteiro da Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela paciência, colaboração, revisão e orientação na estrutura e formato da tese.

Aos técnicos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – LIM06 as quais durante esses cinco anos de convivência, me ajudaram a vencer todas as dificuldades e me foram de todo carinho e dedicação.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim, os meus mais profundos agradecimentos.

"A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído"

Confúcio

RESUMO

Santos SV. *Infecção concomitante experimental de* Rattus norvegicus *por* Toxocara canis *e* Toxoplasma gondii*: estudo comportamental e histopatológico* (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

A hipótese de "manipulação comportamental" supõe que um parasito pode alterar o comportamento de seu hospedeiro visando aumentar a probabilidade de completar seu ciclo evolutivo. Tais alterações aumentariam a taxa de transmissão hospedeiro-hospedeiro, assegurando ao parasito ou a seus propágulos o encontro de novo hospedeiro. A possibilidade de infecções parasitárias provocarem mudanças comportamentais em seus hospedeiros e a elevada frequência com que o acometimento de seres humanos por larvas de *Toxocara* e cistos de *Toxoplasma* ocorre, têm chamado à atenção de pesquisadores interessados no estudo das relações hospedeiro-parasita. Na infecção por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis*, cistos e larvas estão presentes em diversos locais anatômicos incluindo musculatura, coração, pulmões, olhos e cérebro. A presença de parasitos no cérebro dá oportunidade de manipulação do comportamento do hospedeiro. Entretanto, não se sabe qual ou quais mecanismos estão envolvidos no processo de manipulação do comportamento. Os objetivos do presente estudo foram verificar alterações na ansiedade, medo, memória e aprendizagem de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* em dois períodos após infecção, bem como a localização das larvas e cistos e presença de placas beta amiloide (βA) na região do hipocampo no tecido cerebral desses roedores corado pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), e Vermelho de Congo, respectivamente. Foram utilizadas 40 exemplares fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, com seis a oito semanas. Os animais foram divididos em quatro grupos: *Toxocara* – 10 ratos infectados com 300 ovos de *Toxocara canis*, *Toxoplasma* –10 ratos infectados com 10 cistos de *Toxoplasma gondii*, Infecção dupla – 10 ratos infectados com 300 ovos de *Toxocara canis* e 10 cistos de *Toxoplasma gondii*, e controle – 10 ratos sem infecção. Nos dias 40, 41, 70 e 71 após a infecção, os animais dos grupos infectados e controle foram submetidos à avaliação no Labirinto em Cruz Elevado e Campo aberto. Aos 120 após infecção foi feita avaliação da memória, aprendizado e aversão a urina de gato dos animais no Labirinto de Barnes. No final das análises comportamentais os animais foram levados a eutanásia para retirada do cérebro e confecção dos cortes histológicos preparados em HE e Vermelho de Congo. Os resultados mostraram efeito ansiolítico para ambas as infecções, principalmente para *Toxoplasma gondii*. Não houve comprometimento da memória e aprendizado no LB, porém os animais infectados por *Toxocara canis* ou *Toxoplasma gondii* apresentaram menor tempo para encontrar a toca com urina e entrar nela. A leitura dos cortes histológicos corados com HE mostraram larvas de *Toxocara canis* e cistos de *Toxoplasma gondii* em regiões do sistema nervoso central dos animais relacionadas com memória e aprendizado. As lâminas coradas com Vermelho de Congo apresentaram placas beta amiloides (βA) em metade dos animais infectados por *Toxoplasma gondii*. Conclui-se que a infecção por ambos os parasitos apresenta efeito ansiolítico quando ocorre infecção única. Quando a Infecção ocorre concomitantemente há modulação no comportamento. Além disso, ratas infectadas com infecção única apresentam-se menos aversivas à urina de gatos.

DESCRITORES: Toxocaríase. Toxoplasmose. Comportamento animal. Ratos.

ABSTRACT

Santos SV. *Experimental concomitant infection of* Rattus norvegicus *by* Toxocara canis *and* Toxoplasma gondii*: behavioral and histopathological study* (tesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

The hypothesis of "behavioral manipulation" states that a parasite can change the behavior of its host specifically to improve the chances of completing its life cycle. It means the increase of transmission host to host and ensures that the parasite or their propagules are released in appropriate place increasing their survival. The possibility of parasitic infections to cause behavioral changes in their hosts and the high frequency which the involvement of humans by larvae of *Toxocara* and *Toxoplasma* cysts occur, have called the attention of researchers interested in the study of host/parasite relationships. In human beings *Toxoplasma gondii* cysts and *Toxocara canis* larvae infections are present in various anatomical sites including muscles, heart, lungs, eyes and brain. The presence of parasites in brain gives opportunity of manipulation of the host behavior. However, the mechanisms involved in the behavior changes are still unclear. The aims of this study were to assess changes in anxiety, fear, memory and learning, as well as the larvae, cysts and the presence of beta amyloid plaques (βA) in the hippocampus region of the brain tissue of the *Rattus norvegicus* experimentally infected with *Toxocara canis* and/or *Toxoplasma gondii*, in two stages of infection, satained with hematoxylin/eosin (HE) and Red Congo techniques, respectively. Eighty female *Rattus norvegicus* species, aged six to eight weeks-old were used. The animals were divided into four groups: *Toxocara* – 10 rats infected with 300 *Toxocara canis* eggs, *Toxoplasma* - 10 rats infected with 10 cysts of *Toxoplasma gondii*, double infection - 10 mice infected with 300 *Toxocara canis* eggs and 10 *Toxoplasma gondii* cysts, and control - 10 rats without infection. In the days 40, 41, 70 and 71 after infection, the infected animals and that belonging to the control group were evaluated in the Elevated plus-maze (EPM) and Open-field (OF). At 120 days after infection the memory and learning evaluation and aversion to cat urine by the rats were assessed in the Barnes maze. At the end of the behavioral analysis the animals were euthanized to remove the brain and preparation of histological sections stained by Hematoxylin/Eosin (HE) and Congo Red. The results showed anxiolytic effect for both infections, especially for *Toxoplasma gondii*. There was no impairment of memory and learning in LB, but the animals infected by *Toxocara canis* or *Toxoplasma gondii* spent less time to find the burrow with urine and entering it. The reading of the histological sections stained with HE showed larvae of *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii* cysts in regions of the central nervous system of animals related to memory and learning. The slides stained with Congo Red showed βA-plate for the majority of animals infected by *Toxoplasma gondii*. It is concluded in the single infection, to both parasites, produced anxiolytic effect. When infections occur concomitantly there was a modulating effect in rats' behavior. In addition, rats infected with single infection presents less aversive urine cats.

DESCRIPTORS: Toxocariasis. Toxoplasmosis. Animal behavior. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES – FIGURAS

Figura 1 Evolução de ovos de *Toxocara canis* em cultura *in vitro* 32

Figura 2 Labirinto em Cruz Elevado 35

Figura 3 Gaiola para movimentação espontânea em campo aberto (*Cage Activity*) 36

Figura 4 Labirinto Terrestre de Barnes 38

Figura 5 Esquema mostrando a sequência de jogos gerados de cada hemisfério cerebral de cada rato 40

Figura 6 Cortes histológicos de cérebros de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxocara canis*, objetiva de 40x 60

Figura 7 Cortes histológicos de cérebro de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii*. A e B aumento de 1000x, C=aumento de 400x, D=aumento de 40x, E=aumento de 40x e F=aumento de 400x 61

Figura 8 Corte histológico de tecido cerebral de *Rattus norvegicus* sem infecção, corado com Vermelho de Congo evidenciando parede de vaso cerebral. A=luz normal e B=Luz polarizada 62

Figura 9 Corte histológico de tecido cerebral de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii*, corado com Vermelho de Congo A,C,E e G=luz normal e B,D,F e H=Luz polarizada 63

Figura 10 Avaliação da memória espacial de *Rattus norvegicus* na fase crônica da infecção por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* no Labirinto Terrestre de Barnes 64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES – GRÁFICOS

Gráfico 1 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços abertos (EBA), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi 44

Gráfico 2 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços abertos (EBA), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi 45

Gráfico 3 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços fechados (EBF), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi 45

Gráfico 4 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços fechados (EBF), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi 46

Gráfico 5 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis*, no fundo dos braços abertos (FBA) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi 46

Gráfico 6 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no fundo dos braços abertos (FBA) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi 47

Gráfico 7 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no fundo dos braços fechados (FBF) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi 47

Gráfico 8 Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no fundo dos braços fechados (FBF) avaliados no Labirinto em cruz elevado aos 70 dpi 48

Gráfico 9 Média e erro padrão da permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços abertos (TBA) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi 48

Gráfico 10 Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus infectados* por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços abertos (TBA) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi 49

Gráfico 11 Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus*

norvegicus infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços fechados (TBF) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi 49

Gráfico 12 Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços fechados (TBF) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi 50

Gráfico 13 Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis*, no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi .. 50

Gráfico 14 Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis*, no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi .. 51

Gráfico 15 Média e erro padrão da frequência de *head dipping* de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis*, avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi 51

Gráfico 16 Média e erro padrão da frequência de *head dipping* de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii*, avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi 52

Gráfico 17 Média e desvio padrão da densidade optica (DO) do soro de *Rattus norvegicus analisados* por meio do kit BDNF-ELISA dos grupos controle, *Toxocara*, *Toxoplasma* e Dupla aos 40 dpi 52

Gráfico 18 Média e desvio padrão da densidade optica (DO) do soro de *Rattus norvegicus analisados* por meio do kit BDNF-ELISA dos grupos controle, *Toxocara*, *Toxoplasma* e Dupla aos 70 dpi 53

Gráfico 19 Curva padrão da relação entre a quantidade de BDNF e a densidade óptica observada no teste ELISA-BDNF 53

Gráfico 20 Média e erro padrão dos movimentos verticais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* no teste de atividade motora espontânea em campo aberto aos 41 dpi 55

Gráfico 21 Média e erro padrão dos moviementos verticais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no teste de atividade motora espontânea em campo aberto aos 71 dpi 55

Gráfico 22 Média e erro padrão dos movimentos horizontais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no teste de atividade motora espontânea em campo aberto aos 41 dpi 56

Gráfico 23 Média e erro padrão dos movimentos horizontais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara*

canis no teste de atividade motora espontânea em campo aberto aos 71 dpi 56

Gráfico 24 Média e erro padrão do tempo de imobilidade de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* avaliados no teste de atividade motora espontânea em campo aberto aos 71 dpi 57

Gráfico 25 Avaliação da memória espacial e aprendizado de *Rattus norvegicus* na fase crônica da infecção por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no Labirinto Terrestre de Barnes e desafiado com urina de gato 72h após treinos..... 65

Gráfico 26 Avaliação da memória espacial e aprendizado de *Rattus norvegicus* na fase crônica da infecção por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no Labirinto Terrestre de Barnes e desafiado com urina de gato 72h após treinos 65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES – TABELAS

Tabela 1 Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle e dos grupos infectados por *Toxocara canis*, *Toxoplasma gondii* e infecção dupla aos 40 dpi 54

Tabela 2 Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle e dos grupos infectados por *Toxocara canis*, *Toxoplasma gondii* e infecção dupla aos 70 dpi 54

Tabela 3 Média, desvio padrão e erro padrão do tempo de imobilidade em campo aberto após 41 e 71 dias após infecção 57

Tabela 4 Média, desvio padrão e errro padrão do tempo de *grooming* em campo aberto aos 41 e 71 dias após infecção 58

Tabela 5 Média, desvio padrão e erro padrão dos *pellets* recuperados de *Rattus norvegicus* de todos os grupos avaliados em campo aberto aos 41 e 71 dias após a infecção 58

Tabela 6 Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle e dos grupos infectados por *Toxocara canis*, *Toxoplasma gondii* e infecção dupla aos 41 dpi 59

Tabela 7 Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle e dos grupos infectados por *Toxocara canis*, *Toxoplasma gondii* e infecção dupla aos 71 dpi 59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 *Toxocara canis* 18
1.1.1 Ciclo de Vida 18
1.1.2 Toxocaríase humana 19
1.2. *Toxoplasma gondii* 20
1.2.1 Ciclo de Vida 20
1.2.2 Toxoplasmose humana 21
1.3 Alterações Comportamentais em Animais Parasitados..... 22
1.4 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) 24
1.5 Atividade motora em campo aberto 25
1.6 Labirinto Terrestre de Barnes 26
1.7 Beta-Amiloide 26
1.8 *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) 27
2 OBJETIVOS 28
2.1 Objetivo Geral 29
2.2 Objetivos Específicos 29
3 MATERIAL E MÉTODOS 30
3.1 Obtenção dos animais 31
3.2 Obtenção dos ovos de *Toxocara* canis 31
3.3 Obtenção de cistos de *Toxoplasma gondii* 32
3.4 Análise do Ciclo estral 33
3.5 Avaliação do comportamento 33
3.5.1 Procedimento no LCE 34
3.5.2 Procedimento em campo aberto (Actômetro) 35
3.5.3 Procedimento no Labirinto Terrestre de Barnes 37
3.6 Análise dos níveis de BDNF 38
3.7 Análise histopatológica 39
3.7.1 Técnica Hematoxilina e Eosina 40
3.7.2 Técnica Vermelho de Congo 41
3.8 Digestão ácida dos órgãos para recuperação de larvas de *T. canis*..... 41
3.9 Análise Estatística 42
4 RESULTADOS 43
4.1 Avaliação do Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)..... 44
4.1.1 Número de entradas nos braços abertos e fechados 44
4.1.2 Tempo de permanência nos braços abertos 48
4.1.3 Tempo de permanência nos braços fechados 49
4.1.4 Tempo de permanência no centro 50
4.1.5 “Head dipping” 51
4.2 Quantificação de BDNF 52
4.3 Ciclo estral 53
4.4 Avaliação do comportamento em Campo Aberto (Actômetro) 54
4.4.1 Variável Levantar nas patas dianteiras 54
4.4.2 Variável Deambulação 55
4.4.3 Tempo de imobilidade 56
4.5 Ciclo estral 58
4.6 Cortes histopatológicos corados com Hematoxilina/Eosina (HE) 60
4.6.1 Grupo *Toxocara canis* 60
4.6.2 Grupo *Toxoplasma gondii* 61
4.7 Vermelho Congo – Luz Polarizada 61

4.7.1 Grupo Controle 62
4.7.2 Grupo *Toxoplasma gondii* 63
4.8 Avaliação da Memória espacial e aprendizado no Labirinto Terrestre de Barnes 64
4.9 Digestão ácida dos órgãos para recuperação de larvas de *T. canis*..... 65
5 DISCUSSÃO 66
6 CONCLUSÕES 77
REFERÊNCIAS 79
ANEXOS 94

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hipótese de “manipulação comportamental” afirma que, um parasito pode alterar o comportamento de seu hospedeiro, especificamente para melhorar a probabilidade de completar seu ciclo de vida. Tal situação facilitaria a transmissão hospedeiro/hospedeiro e asseguraria ao parasito, ou a seus propágulos, a liberação em locais apropriados, aumentando sua probabilidade de sobrevivência[1, 2, 3]. Combes[4], ao estudar os aspectos etológicos da transmissão de parasitos, conceituou esse fenômeno como “favorecimento”, onde o parasito altera o comportamento do hospedeiro com o intuito de facilitar a transmissão, por meio da relação presa-predador. Essa afirmação tem chamado a atenção de vários pesquisadores[1,2,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23].

A possibilidade de infecções parasitárias provocarem mudanças comportamentais em seus hospedeiros[9] e a elevada frequência com que o acometimento de seres humanos por larvas de *Toxocara*[24,25,26] e cistos de *Toxoplasma gondii* ocorre[8], motivaram pesquisadores a verificar alterações comportamentais em roedores experimentalmente infectados por esses parasitos, utilizando equipamentos padronizados, tais como, Labirinto em Cruz Elevado e Campo aberto para avaliação da ansiedade e medo[27,28,30,5,6,29,23].

A maioria dos estudos das alterações comportamentais em hospedeiro parasitado são verificados na fase crônica da infecção, pois a presença de cistos ou larvas no sistema nervoso central representa fator importante para desencadear manipulação comportamental do organismo parasitado[31]. Além disso, existe relação entre infecção por *Toxocara canis* ou *Toxoplasma gondii* e doenças neuropsiquiátricas, como por exemplo, Alzheimer e Esquizofrenia. Por esta razão, para melhor compreensão das alterações comportamentais supostamente induzidas pelo parasito, faz-se necessário a detecção das regiões cerebrais

afetadas pelo parasito, período da infecção[1,32,33], bem como presença de placas senis no sistema nervoso central do hospedeiro parasitado.

A maioria dos trabalhos experimentais utiliza infecção única para estudo das alterações comportamentais, entretanto, sabe-se que na natureza existe a possibilidade de ocorrer infecções concomitantes por espécies distintas de parasitos[34] que estimulam respostas imunológicas no hospedeiro com perfis diferenciados[35,36].

1.1 *Toxocara canis*

Toxocara canis é helminto parasito de canídeos. A distribuição deste parasito é mundial, ocorrendo principalmente em países emergentes[37,38].

A transmissão de *Toxocara canis* para cães ocorre via ingestão dos ovos embrionados presentes no ambiente, pela predação de hospedeiros paratênicos, via transmamária e transplacentária e ingestão de L5 (larva de quinto estádio) pela fêmea na higienização de seus filhotes[39,38].

1.1.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Toxocara* spp. é complexo, pois após serem ingeridas pelo hospedeiro definitivo, as larvas migram do intestino para o sistema sanguíneo, passando para o fígado, coração e pulmões. Nos pulmões, as larvas podem seguir dois caminhos, dependendo principalmente da idade do hospedeiro e da ocorrência de infecções anteriores. No primeiro, que ocorre principalmente em cães filhotes, conhecido como migração traqueal, as larvas penetram nos alvéolos pulmonares, sobem a árvore brônquica, chegam até a faringe e são deglutidas voltando para o intestino tornando-se machos e fêmeas adultos e consequentemente eliminando

mais ovos. No segundo caso, conhecido como migração somática, as larvas não conseguem penetrar os alvéolos, devido à proteção adquirida pelo hospedeiro em infecção prévia. Neste caso, as larvas migram para outros órgãos e tecidos, permanecendo em estado de latência e podem sobreviver por um longo período. Além disso, as larvas presentes na musculatura das fêmeas prenhes são estimuladas a migrar para o útero e glândulas mamárias, o que facilita a transmissão vertical desse parasito[40,41,42].

A ocorrência de toxocaríase em seu hospedeiro definitivo é mais frequente em animais jovens, sendo que em cães adultos existe a proteção adquirida pelo sistema imune durante a fase juvenil. Além disso, os filhotes estão mais expostos aos meios de transmissão, principalmente as vias transplacentária e transmamária[42,43].

Outros animais, inclusive o ser humano, podem infectar-se com estes ascarídeos, porém não haverá desenvolvimento de adultos no intestino. Neste caso as larvas migram para os tecidos permanecendo em estado de latência, podendo sobreviver por um longo período. Contudo, há relatos na literatura de adultos e crianças albergando exemplares adultos de *Toxocara canis* em seu intestino[44,45], provavelmente em decorrência de infecção acidental por L5.

1.1.2 Toxocaríase humana

A infecção humana pode ocorrer por vários mecanismos, tais como: ingestão acidental de ovos contendo larva de terceiro estádio (L3) presentes no ambiente, ingestão de carne ou vísceras cruas ou malcozidas de hospedeiros paratênicos que alberguem larvas de terceiro estádio em seus tecidos. Crianças entre 2 e 6 anos são mais acometidas clinicamente por *Toxocara* spp., porém é crescente o relato de acometimento de adultos[37,38,39,43,46].

A toxocaríase é uma importante zoonose causada pela migração de larvas de *Toxocara* spp. nos tecidos e órgãos de seres humanos, podendo ocasionar três tipos de síndromes: Larva Migrans Visceral (LMV), Larva Migrans Ocular (LMO) e Toxocaríase Oculta (TO). O diagnóstico é confirmado pela associação dos níveis de eosinófilos no sangue e sorologia positiva, entretanto é difícil estabelecer se trata-se de infecção crônica ou aguda[39, 43,47].

A infecção por *Toxocara* em humanos tende a ser assintomática e autolimitante, dispensando tratamento. Porém, para casos sintomáticos da infecção, existem medicamentos disponíveis para amenizar a gravidade da doença. Além disso, a escolha da droga dependerá de diversos fatores, incluindo a disponibilidade do medicamento, bem como a experiência no tratamento da toxocaríase[48,49].

1.2 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é protista intracelular obrigatório, capaz de infectar mamíferos e aves podendo causar doença denominada toxoplasmose. A toxoplasmose tem significante impacto nas áreas econômica, veterinária e em Saúde Pública[50,51,52] e tem despertado interesse devido sua reativação em indivíduos com Sindrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e outros pacientes imunossuprimidos[52].

1.2.1 Ciclo de Vida

Toxoplasma gondii tem ciclo de vida heteroxênico e os felídeos são os únicos hospedeiros onde o parasito desenvolve ciclo enteroepitelial (fase sexuada) com eliminação de oocistos não esporulados pelas fezes. No ambiente, em

condições adequadas de umidade e temperatura, os oocistos tornam-se esporulados e infectantes cerca de 24 horas após sua eliminação. O ciclo extra-intestinal de *Toxoplasma gondii* (fase assexuada), com formação de cistos (bradizoítas) e pseudocistos (taquizoítas), se desenvolve nos tecidos de todos os hospedeiros inclusive no homem[53].

A fase assexuada envolve proliferação rápida de taquizoítas em células nucleadas, com formação de pseudocistos. Após ativação do sistema imune do hospedeiro, ocorre diferenciação de taquizoítas para bradizoítas, com proliferação lenta e formação de cistos, preferencialmente no sistema nervoso central[3,53]. Cistos teciduais contendo bradizoítos resistem ao suco gástrico e, ao serem ingeridos, podem iniciar a próxima fase da infecção. Felinos não imunes, ao ingerirem cistos presente na musculatura de animais de sangue quente, principalmente roedores ou aves infectadas, desenvolvem no interior das células intestinais, a fase assexuada (merogonia) com formação de merozoítas e a fase sexuada (gametogonia) com formação dos oocistos[53].

1.2.2 Toxoplasmose humana

A infecção por *Toxoplasma gondii* constitui uma das zoonoses mais difundidas no mundo. As principais vias de transmissão para seres humanos ocorrem pela ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente que contaminam água, frutas e verduras, pela ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos viáveis do parasito e pela via transplacentária. A transmissão pode ocorrer também por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e seringas contaminadas, sendo essas vias de menor importância[54,55,56,57,58].

A manifestação clínica da doença causada por *Toxoplasma gondii* está relacionada com a imunidade e origens genéticas do parasito, sendo que a variação

na manifestação da doença está relacionada a fatores inerentes ao parasita, tais como: dose do inóculo, estágio infectante, via de infecção e genótipo do parasita. Embora a infecção por *Toxoplasma gondii* seja considerada, na maioria dos casos, assintomática, podem ocorrer implicações em pacientes imunocomprometidos, como resultado de infecção primária ou predisposição ao risco de reativação da infecção crónica[54] e em crianças infectadas congenitamente, como resultado de infecção primária da mãe[59].

A transmissão congênita da toxoplasmose pode apresentar quadros clínicos de diferentes gravidades. Algumas crianças apresentam quadro típico em que se observam calcificações intracranianas, coriorretinite (grave e bilateral), hidrocefalia ou microcefalia, alterações psicomotoras e convulsões. Comprometimento visceral e ocular também podem ocorrer[60,61,62]. Segundo Ferreira et al.[62], cinco a 15 por cento das infecções congênitas resultam em aborto e oito a dez por cento em lesões graves, oculares ou do sistema nervoso central. Entre as crianças assintomáticas, sequelas neurológicas ou oculares podem desenvolver-se mais tarde, até mesmo na idade adulta[60,63]. Segundo Beazley e Egerman[64], a coriorretinite ocorre em mais de 80% dos pacientes com 20 anos de idade.

O tratamento das infecções primárias sintomáticas e reativações é feito com a combinação sinérgica de sulfadiazina e pirimetamina. Na gravidez utiliza-se a espiramicina ou a clindamicina[60,62,64,65].

1.3 Alterações Comportamentais em Animais Parasitados

Existem na literatura exemplos clássicos de alteração de comportamento em insetos e moluscos parasitados por helmintos. É o caso de *Dicrocoelium dendriticum*, um parasito que tem como hospedeiro definitivo ovelhas e hospedeiro intermediário formigas. As formigas, quando parasitadas, são “influenciadas” a subir

na parte superior das gramíneas, o que facilitaria a ingestão delas por ovelhas, fechando o ciclo do parasito.

Leucochloridium é outro parasito digenético que altera a forma e coloração dos tentáculos de moluscos, seus hospedeiros intermediários. Além disso, os moluscos parasitados preferem ficar na parte alta da vegetação, tornando-se visíveis para pássaros, hospedeiros definitivos do parasito[20,66].

Paragordius tricuspidatus, conhecido popularmente como *hairworm*, tem parte da sua vida no ambiente aquático – fase adulta reprodutiva - e parte dentro de gafanhotos terrestres – fase juvenil. Gafanhotos quando parasitados, por influência de um conjunto de proteínas liberado pelo parasito que atua no sistema nervoso, são induzidos à busca por ambientes aquáticos e a jogarem-se na água, após o quê o verme sai para este meio, que é o ambiente necessário para sua reprodução[12,13].

A infecção de humanos por *Plasmodium* torna o hospedeiro mais atrativo para os mosquitos (*Anopheles*), vetor biológico do parasito. *Plasmodium* altera receptores de estiramento da parede intestinal dos mosquitos dando a sensação de estomago vazio levando ao aumentando da quantidade de picadas e a probabilidade de transmissão do parasito[31].

Na infecção por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis*, cistos e larvas, respectivamente, estão presentes em diversos locais anatômicos incluindo musculatura, coração, pulmões, olhos e cérebro. A presença de parasitos no cérebro dá oportunidade de manipulação do comportamento do hospedeiro[3,67,68].

Em roedores, cistos de *Toxoplasma gondii* no cérebro podem modular substâncias como corticosterona e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) capazes de suprimir ou exacerbar comportamentos, e que, em situação de fuga na relação presa-predador, esses animais tendem a ficar mais expostos e consequentemente são predados com facilidade[69].

No presente trabalho foi avaliada a ocorrência de alterações de comportamento decorrentes da infecção única e concomitante por *Toxocara canis* e *Toxoplasma gondii* em fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, murídeos que, em condições naturais, têm sido encontrados albergando infecção por esses parasitos[34], e que pouco têm sido utilizados como modelo experimental. Além disso, foram avaliados o aprendizado, a memória e comportamento aversivo à urina de gato dos roedores no Labirinto de Barnes, bem como presença de larvas de *Toxocara canis*, cistos de *Toxoplasma gondii* e placas amiloides nos cortes histológicos do sistema nervoso central por meio das técnicas de coloração Hematoxilina/eosina e Vermelho de Congo, respectivamente. A concentração de BDNF no soro das ratas também foi analisada por meio do teste ELISA-BDNF.

1.4 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Labirinto em cruz elevado (LCE) é o método mais utilizado na pesquisa da ansiedade em roedores e tem como base, respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos[70,71,72]. Derivou do trabalho de Montgomery[72] que descreveu pela primeira vez forte conflito de aproximação e esquiva de roedores, quando colocados em um aparato em forma de “Y”, e que os animais exploravam com maior frequência o braço fechado do aparato quando comparado com o braço aberto. O autor interpretou essa aversão ao braço aberto como sendo gerada pela neofobia e pela elevação do mesmo[70].

Estudos iniciais com o LCE foram realizados por Handley e Mithani[73] na pesquisa dos efeitos de uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos em roedores. O aparelho era constituído de dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares, cada qual medindo 45x10 cm e situava-se 70 cm acima do solo. Os braços fechados

apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. Os autores constataram que havia um aumento na proporção entre entradas nos braços abertos e o total de entradas dos animais utilizando ansiolíticos como diazepam, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuíam esta proporção.

Além da utilização do labirinto em cruz elevado para verificar ansiedade em animais tratados com drogas ansiogênicas/ansiolíticas tem-se utilizado também para análise da alteração comportamental de animais experimentalmente infectados por parasitos[5,10].

1.5 Atividade motora em campo aberto

Hall[74] desenvolveu o campo aberto com o intuito de analisar a emocionalidade em roedores. O aparato inicial tinha forma circular, com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, fechado lateralmente com parede de madeira de 0,45 m de altura. O procedimento consistia em confrontar o animal com um ambiente novo observando variáveis comportamentais, tais como: locomoção, erguer-se sobre as patas traseiras (*rearing*), auto-limpeza (*grooming*), eliminação de *pellets* fecais e tempo gasto na área central do aparato.

Vários autores relataram que roedores preferem permanecer na periferia do aparato e que ao se locomoverem mantinham sempre contato com as paredes, ou seja, apresentavam tigmotaxia[75,76,77,78,79].

A utilização deste modelo para avaliar a ansiedade de roedores tem sido proposta, levando em consideração que o aumento na deambulação e maior tempo de permanência na região central do aparato indicam uma redução na ansiedade[79,80].

1.6 Labirinto Terrestre de Barnes

O labirinto Terrestre de Barnes foi desenvolvido por Carol Barnes[81] em 1979, como alternativa ao Labirinto de Morris. A utilização do Labirinto Barnes tem o propósito de avaliar o aprendizado e memória espacial de roedores. Sua estrutura consiste de plataforma circular branca com 18 furos espaçados uniformemente ao redor do perímetro. Ao serem colocados no centro do aparelho, os ratos são motivados pelo brilho da luz aversiva e o espaço aberto do labirinto a esconder-se na toca inserida embaixo de um dos furos. Para encontrar a toca verdadeira, os roedores utilizam-se de pistas anexadas na parte externa ou na parede do labirinto[81].

No Labirinto de Barnes o aprendizado é medido pela diminuição da latência a cada execução da tarefa de encontrar a caixa de escape a cada teste em cada dia. A memória é medida pela diminuição desta latência quando a tarefa for executada por mais de 24 horas após a execução anterior[81].

1.7 Beta-Amiloide (Aβ)

Beta-Amiloide é um peptídeo curto, ou fragmento de proteína, isolado e descrito pela primeira vez em 1984 por George G. Glenner e Cai'ne W. Wong, derivado de uma proteína maior denominada Proteína Precursora de Amilóide (APP). As moléculas de APP inseridas na membrana celular, com parte da proteína voltada para o interior da célula e outra para o exterior, podem sofrer ação de duas proteases, β-secretase e γ-secretase, que dará origem ao processo amiloidogênico que conduz a liberação de peptídeos Aβ[82,83].

Uma das principais características na doença de Alzheimer é a presença de placas amiloides, compostas por agregados fibrilares de peptídeos Aβ[82]. Além

disso, depósitos amilóides também foram encontrados em outras desordens cerebrais de origem tumoral, vascular, degenerativa ou infecciosa[84,85,86.]

1.8 *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF)

Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), pequena molécula de proteína dimérica, membro da família das neurotrofinas, está presente no sistema nervoso central e periférico e desempenha importante papel no crescimento, diferenciação celular, conectividade sináptica, plasticidade e reparo neuronal[87,88,89,90,91].

Uma vez que BDNF desempenha papel importante no funcionamento do cérebro, pesquisadores chamam a atenção para a relação entre BDNF, esquizofrenia e depressão. Diversos estudos foram empreendidos para demonstrar os níveis de BDNF no soro e plasma de pacientes com depressão e esquizofrenia[87.] Além disso, Komulainen et al.[92] relataram que BDNF no plasma é um biomarcador do comprometimento da memória e funções cognitivas em mulheres idosas.

BDNF aparece em grande concentração no hipocampo, córtex cerebral e amígdala[93], regiões que são extensamente afetadas pela deposição das placas amiloides e filamentos helicoidais pareados[94].

Infecção por *Toxoplasma gondii* também tem sido relacionada com quantidade de BDNF presente no cérebro de ratos[95]. Porém, não há na literatura dados sobre interferência da infecção concomitante por *Toxocara canis* e *Toxoplasma gondii* na expressão de BDNF no soro de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados.

2 OBJETIVOS

2 OBJTIVOS

2.1 Objetivo Geral

a) Avaliar ansiedade, medo, aprendizado, memória espacial de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii*.

2.2 Objetivos específicos

a) Verificar presença de larvas de *Toxocara canis* e cistos de *Toxoplasma gondii* no cérebro de *Rattus norvergicus* experimentalmente infectados;
b) Verificar quantidade de BDNF no soro de *Rattus norvegicus* após infecção crônica por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii*;
c) Verificar o comportamento aversivo de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectado por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* a urina de gato;
d) Verificar presença de placas amiloides no cérebro de *Rattus norvegicus* infectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais

Exemplares fêmeas de *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas apropriadas com cinco animais em cada uma, fornecendo-se água e alimento *ad libitum*. As gaiolas foram inspecionadas diariamente e efetuou-se limpeza duas vezes por semana. A sala em que as gaiolas permaneceram depositadas estava equipada com exaustão de ar e dispositivo para promover alternância de períodos claros e escuros a cada 12 horas. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEUA/IMT) registrado sob o número 2011/098 (Anexo A).

3.2 Obtenção dos ovos de *Toxocara canis*

Os ovos de *Toxocara canis* empregados na infecção experimental foram obtidos por dissecção de fêmeas desses helmintos, recuperadas de cães naturalmente infectados. Após serem retirados do útero das fêmeas, os ovos foram mantidos a 28º C, em solução de formalina a 2% durante 30 dias, período necessário para permitir sua evolução e formação de larvas de terceiro estádio (Figura 1).

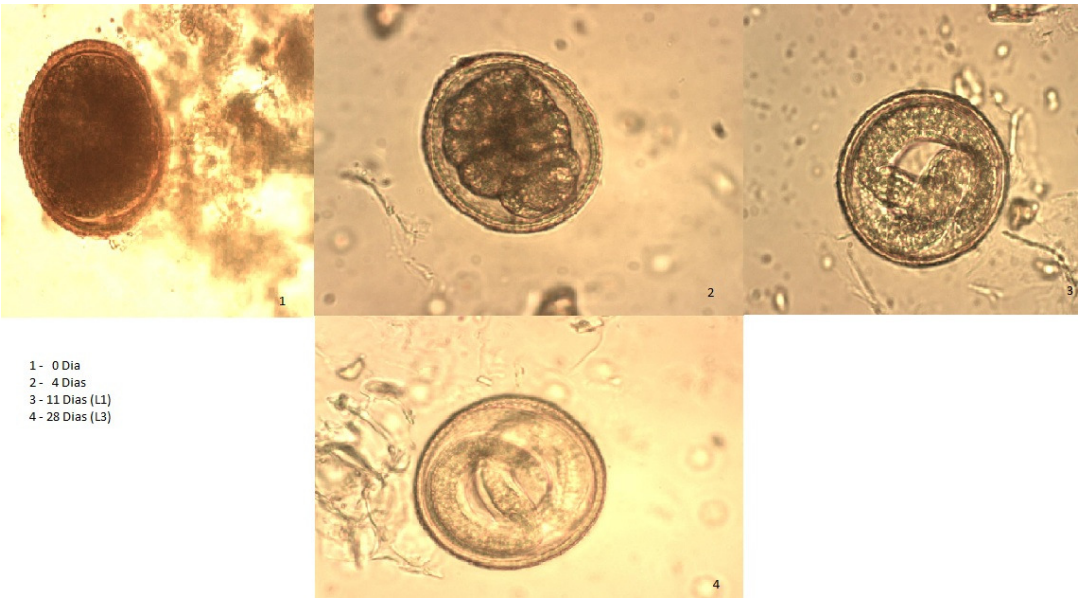


Figura 1 - Evolução de ovos de *Toxocara canis* em cultura *in vitro*.

3.3 Obtenção dos cistos de *Toxoplasma gondii*

Os cistos foram obtidos a partir do sistema nervoso central de camundongos mantidos com infecção experimental no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. A cepa cistogênica utilizada foi ME49, referente ao genótipo II. No laboratório de Protozoologia foi feita eutanásia dos camundongos infectados em câmara de dióxido de carbono (CO2). Após a eutanásia, o cérebro foi retirado e colocado em seringa de 10 mL contendo 5 mL de solução salina a 0,85% para maceração do cérebro, vertendo o conteúdo da seringa em tubo cônico de 50mL. Em seguida, retirou-se 25µL da suspensão e colocou-se em lâmina coberta com lamínula (24 x 50mm) para quantificação dos cistos em microscópio óptico (aumento de 40 vezes). Após quantificação, foram ajustados 10 cistos por 0,1 mL de solução salina que foram utilizados como inoculo para infecção dos animais.

3.4 Análise do ciclo estral

Para determinar o ciclo estral dos animais foi utilizada técnica de esfregaço do lavado vaginal para identificação dos tipos celulares que caracterizam a fase do ciclo estral, duas horas antes da avaliação comportamental no labirinto em cruz elevado (40 e 70 dias após a infecção) e no Actômetro (41 e 71 dias após a infecção). Esse procedimento foi feito por volta das 7h00 da manhã. A coleta do lavado vaginal foi efetuada pipetando por três vezes consecutivas 50µl de solução fisiológica estéril na vagina das ratas. O líquido final coletado foi colocado em lâmina e coberto por lamínula. A leitura foi feita com aumento de 100x. O perfil celular observado para determinação da fase estral foi: Proestro = presença células epiteliais/nucleadas, Estro = presença de células cornificadas, Metaestro = presença de células nucleadas, cornificadas e leucócitos e Diestro: predominância de leucócitos.

3.5 Avaliação do comportamento

Foram utilizadas 40 exemplares fêmeas de *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com idade variável entre seis e oito semanas, e divididos em quatro grupos: *Toxocara* – 10 ratos infectados com 300 ovos de *Toxocara canis*; *Toxoplasma* – 10 ratos infectados com 10 cistos de *Toxoplasma gondii,* Dupla – 10 ratos infectados com 300 ovos de *Toxocara canis* e 10 cistos de *Toxoplasma gondii* e Controle - 10 ratos sem infecção.

A infecção dos animais foi efetuada via oral, por intermédio de sonda esofágica e nos animais do grupo controle administrou-se, pela mesma via, quantidade equivalente de água destilada.

Nos dias 40 e 70 pós-infecção os animais foram submetidos à avaliação das variáveis comportamentais no labirinto em cruz elevado e 41 e 71 dias após a infecção no Actômetro (campo aberto). O comportamento dos animais foi avaliado por meio de testes em labirinto em cruz elevado, para determinação dos níveis de ansiedade, empregando-se técnica descrita por Pellow et al.[96]. A atividade motora, outro parâmetro comportamental, foi medida por meio da técnica de determinação de atividade motora em campo aberto, com a utilização do aparelho Actômetro (Ugo Basile, Italy), conforme descrição de Guaraldo et al.[97], Nasello et al.[71] e Silva et al.[98].

Após avaliação do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado e Actômetro, os animais foram submetidos ao teste de aprendizado e memória espacial em Labirinto de Barnes[99,100].

Para todos os procedimentos de análise comportamental, os animais previamente foram retirados do biotério e colocados na sala de procedimento durante uma hora para evitar interferência de ambientação.

3.5.1 Procedimento no LCE

Para avaliação dos níveis de ansiedade utilizou-se teste do labirinto em cruz elevado[96,101]. O labirinto em cruz elevado utilizado foi construído a partir do descrito por Handley e Mithani[73], com algumas modificações. O aparato é constituído de madeira de cor branca, com elevação de 50 cm do solo. Possui dois braços abertos de 50x10 cm cruzados perpendicularmente por dois braços da mesma dimensão fechados por parede de madeira de 40 cm de altura com a parte superior aberta. O ponto onde os braços se cruzam é formado por uma arena central de 10x10 cm (Figura 2).

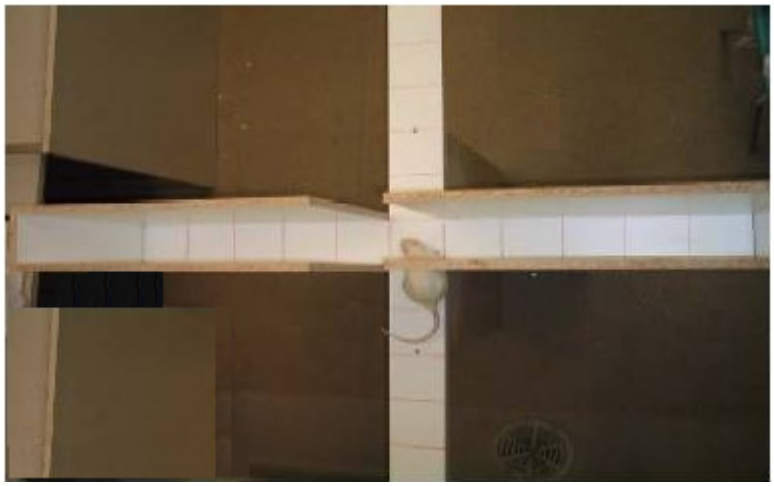


Figura 2 - Labirinto em Cruz Elevado

Uma hora antes do procedimento, os animais foram transferidos para a antessala do laboratório para ambientação. Após este período, os animais foram individualmente levados à sala onde estava posicionado o aparelho e colocados na intersecção dos braços do labirinto, com a cabeça voltada para o braço aberto, em sentido oposto ao avaliador. Cada animal permaneceu no aparelho por 5 minutos. Durante este tempo, foram observadas as variáveis: tempo de permanência dos animais nos braços abertos, fechados e no centro. Frequência de entrada nos braços abertos e fechados, fundo dos braços abertos e dos braços fechados e frequência de mergulhar a cabeça no braço aberto (*head dipping*). Nos intervalos entre cada animal, o aparato foi higienizado com Etanol 5%.

Tomou-se como padrão de entrada nos braços abertos e fechados, quando o animal estivesse com as quatro patas posicionadas nos respectivos braços.

3.5.2 Procedimento no Campo Aberto (Actômetro)

A atividade motora, outro parâmetro comportamental, foi medida por meio da técnica de determinação de atividade motora em campo aberto, conforme

descrição de Guaraldo et al.[97], Nasello et al.[71] e Silva et al.[98], utilizando aparelho Basile 47420 *Multiple Activity Cage* (Figura 3).

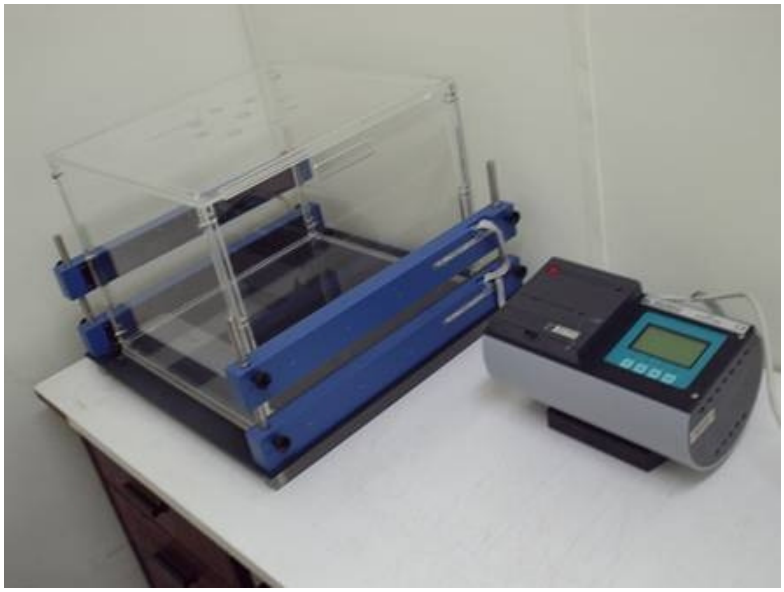


Figura 3 - Gaiola para movimentação espontânea em campo aberto (*Cage Activity*)

Para todos os procedimentos de análise comportamental, os animais foram retirados do biotério e colocados na antessala do laboratório durante uma hora para ambientação.

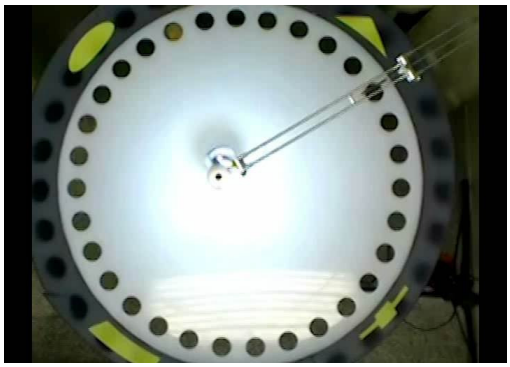
Após período de ambientação, os animais foram individualmente introduzidos na parte central da caixa acrílica do aparato por 5 minutos para observação e registro das variáveis de comportamento: movimentos horizontais e verticais, tempo de *Grooming* (comportamento de autolimpeza), quantidade de *pellets* fecais eliminados e tempo de imobilidade.

Movimentos horizontais e verticais dos animais eram registrados pelo aparelho por meio de quatro barras com sistema de sensor infravermelho dispostas nas laterais da caixa acrílica. As outras variáveis foram manualmente medidas.

3.5.3 Procedimento no Labirinto Terresre de Barnes

A memória espacial e o aprendizado foram avaliados utilizando-se teste do Labirinto Terrestre de Barnes, de acordo com Babovic et al.[99] e Görtz et al.[100]. O equipamento era constituído de material polipropileno no formato de arena, cor branca, com um metro de diâmetro, contendo 18 orifícios vazados (tocas falsas) com 9,5 cm de diâmetro, dispostos radialmente com um metro de elevação do chão (Figura. 4). Todo perímetro da arena era constituído por parede escura com figuras amarelas dispostas na parte interna para facilitar a orientação espacial dos roedores. Sobre o centro da arena, com aproximadamente 50 cm de altura, foi mantida uma lâmpada fluorescente de 21W. Sob um dos 18 orifícios foi acoplada uma caixa de cor escura, contendo maravalha, usada como escape (toca verdadeira) dos roedores. A sala onde estava o equipamento era provida de ventilador que permanecia ligado enquanto as luzes estavam acesas. No dia do experimento, uma hora após ambientação dos animais, cada rato foi colocado no centro do labirinto, dentro de uma câmara acrílica durante um minuto. Após esse período, o animal foi liberado para deambular no labirinto, e o tempo para encontrar a toca verdadeira (caixa escura) foi registrado. O tempo máximo para cada roedor explorar o labirinto e encontrar a caixa de escape foi de cinco minutos. Se o animal encontrasse a toca e entrasse nela, o tempo era interrompido e registrado, as luzes e o ventilador eram desligados e o animal permanecia na caixa durante um minuto. Caso o animal excedesse o tempo máximo e não encontrasse a toca verdadeira, o mesmo era encaminhado pelo pesquisador até a caixa de escape, as luzes e o ventilador eram desligados e o roedor permanecia lá durante um minuto. Após esse tempo, o animal era recolocado no centro do labirinto, dentro da caixa acrílica, durante um minuto. Após esse período, o animal era liberado novamente no labirinto para explorar o ambiente em busca da caixa de escape. Caso o animal

encontrasse a toca e entrasse nela antes do tempo, as luzes e o ventilador eram apagados e o animal permaneceria nela durante um minuto. Se o roedor não obtivesse êxito em encontrar e entrar na toca, ele era reconduzido a toca, as luzes e o ventilador eram desligados durante um minuto. Esse procedimento foi efetuado durante cinco dias consecutivo no período da manhã e tarde. Após dois dias de intervalo, os animais foram desafiados no período da manhã, para avaliação da memória e aprendizado e na parte da tarde com urina de gato para verificar aversão dos ratos para chegar até a toca. Para o desafio da aversão a urina, foi introduzida areia utilizada por gatos, envolvida em gaze, dentro da caixa de escape.



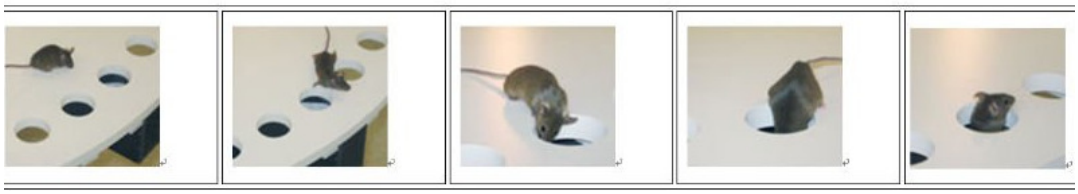


Figura 4 - Labirinto de Barnes
(http://i01.i.aliimg.com/photo/v16/119311479/Barnes_Maze.jpg)

3.6 Análise de BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*)

A quantificação de BDNF no soro dos animais foi analisada por meio de Kit ChemiKine™ BDNF (Chemicon® International, cat. nº CYT306). Os animais foram sangrados, via retrorbital, 42 e 72 dias após infecção. O processamento das amostras e a curva padrão de BDNF foram feitos seguindo orientação do fabricante.

3.7 Análise histopatológica

Para análise histopatológica, após obtenção das variáveis de comportamento, efetuou-se eutanásia dos animais utilizando anestésico inalatório Halotano seguido por decapitação. Em seguida, o cérebro de cada animal foi removido e, após separação dos hemisférios cerebrais, mergulhado imediatamente em solução de dimetilbutano (Sigma) para congelamento a -50ºC e armazenado em freezer a -80ºC até a data do uso[102].

Os cortes histológicos foram feitos em criostato (Micron HM 505N, Francheville, França) em temperatura de -18ºC a -23ºC com espessura de 20µm. A montagem dos cortes foi feita em lâmina gelatinada, alternando os hemisférios cerebrais para cada animal, e acondicionados em caixas fechadas a vácuo e mantidas em temperatura -80ºC até a data do processamento.

Para cada hemisfério originou-se sete jogos (Figura 5) e cada jogo representou uma técnica de coloração. Para o jogo 1 foi utilizada Hematoxilina-eosina para identificação de larvas de *Toxocara canis* e cistos de *Toxoplasma gondii* e o jogo 2 foi utilizado técnica de Vermelho de Congo para identificação de placas amiloides. As lâminas foram analisadas em microscópio marca Nikon modelo E-200 com câmera acoplada e luz polarizada. Os demais jogos permaneceram estocados para utilização em futuras pesquisas.

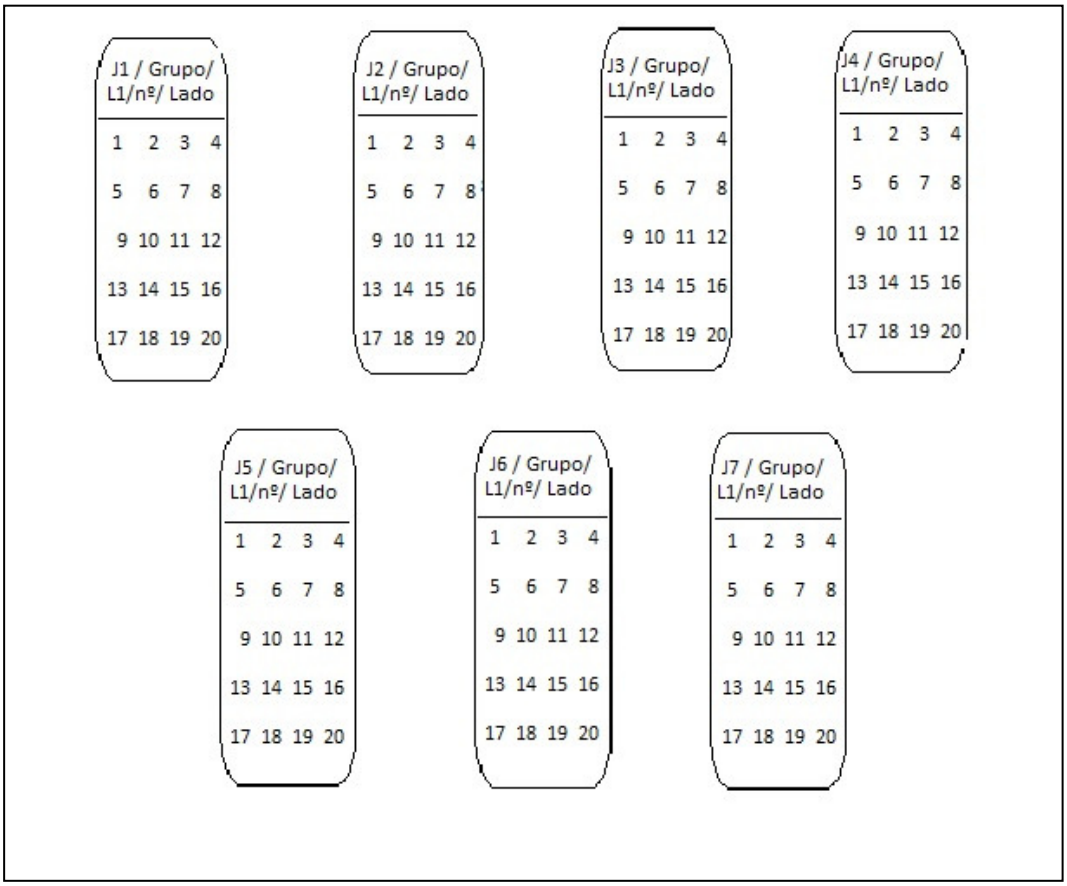


Figura 5 - Esquema mostrando a sequência de jogos gerados de cada hemisfério cerebral de cada rato.

3.7.1 Técnica de Hematoxilina e Eosina

Os cortes congelados foram fixados em Paraformol diluído a 4% em PBS gelado, por 10 minutos, em seguida permaneceram por um minuto em água destilada. Após esse período foram colocados no corante Hematoxilina por 10 minutos e lavados por três minutos em água destilada. Após lavagem, foram corados por 10 minutos na Eosina e em seguida procedeu-se lavagem em água destilada por três minutos. Após passagem pelos corantes, as lâminas permaneceram em Etanol 70% (três minutos), 95% (três minutos), 100% (1) (três minutos) e 100% (2) (três minutos). Em seguida foram colocadas durante três

minutos em Xilol (1) e Xilol (2). Para finalizar, as lâminas foram cobertas com lamínula (24,0 x 60,0 mm) fixadas por Entellan® (cod.1.07961.0100/Merck).

3.7.2 Técnica de Vermelho de Congo

Os cortes foram fixados por 10 minutos em Paraformol diluído a 4% em PBS gelado seguido por lavagem rápida em água destilada. Em seguida, os cortes foram colocados em Vermelho de Congo por uma hora. Após esse período, seguiu-se com lavagem rápida em água destilada, cinco mergulhos em Álcool Alcalino e lavagem em água destilada por um minuto. Em sequência, as lâminas foram mergulhadas em Hematoxilina de Gill por um minuto, lavadas com água destilada por dois minutos. Para o próximo passo, as lâminas permaneceram por três minutos em cada concentração de Etanol (95%, 100%(1) e 100%(2)) e três minutos em Xilol(1) e Xilol(2). Para finalizar, as lâminas foram cobertas com lamínula (24,0 x 60,0 mm) fixadas por Entellan® (cod.1.07961.0100/Merck).

3.8 Digestão ácida dos órgãos para recuperação de larvas de *Toxocara canis*

Após a retirada dos cérebros, realizou-se em cada um dos animais de todos os grupos digestão ácida em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5%, da carcaça, olhos, rins, pulmões e fígado, para confirmar a infecção por *Toxocara canis*. A infecção por *Toxoplasma gondii* foi confirmada pela presença de cistos no cérebro dos animais. Os órgãos foram colocados em béqueres contendo em sua abertura rede com malha fina adaptada e, em seguida, submetidos a solução ácida por um período de 24 horas em estufa a 37º C. Os olhos foram colocados em um béquer de 20mL e os rins em béqueres de 50mL cada um, o fígado e os pulmões

em béqueres de 100mL e a carcaça em béquer de 500mL. Após 24 horas, a solução de cada béquer foi colocada em tubos cônicos de 50mL e centrifugados a 3000 rpm por cinco minutos, até restar apenas um tubo com cinco mL para cada órgão analisado. Colocou-se, então, 50µL de solução em lâmina e lamínula (24 x 50mm) e efetuou-se a leitura ao microscópio óptico, com aumento de 100 vezes, até encontrar larvas de *Toxocara canis*.

3.9 Análise estatística

Após ser confimada a não normalidade da distribuição das variáveis utilizando os testes Kolmogornov-Smirnov, D'Ágostinho e Person e Shapiro-Wilk, utilizou-se análise de variância teste one-way ANOVA, Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's de múltipla comparação[70] para avaliar as variáveis do comportamento no labirinto em cruz elevado e campo aberto e teste de variância de medidas repetidas two-way ANOVA seguido pelo teste Bonferroni[103], utilizando o programa Prisma 5.0 (GraphPad La Jolla, CA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação das variáveis comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

4.1.1 Número de entradas nos braços abertos e fechados.

O teste Kruskal-Wallis ANOVA mostrou diferença estatisticamente significante (p<0,05), 40 dias pós-infecção, entre as médias da frequência de entradas nos braços abertos dos grupos infectados por *Toxocara* (3,85±2,03), *Toxoplasma* (5,75±2,31) e Dupla infecção (4,5±2,80) e o grupo controle (0,75±0,88) conforme ilustrado no gráfico 1. Na avaliação aos 70 dias pós-infecção, não foram observadas diferenças significantes para essas variáveis (gráfico 2).

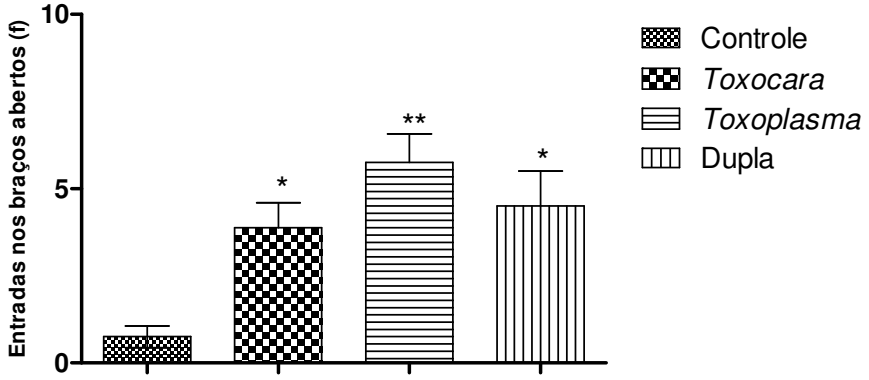


Gráfico 1 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços abertos (EBA), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi. (*) p<0,05, (**) p=0,01.

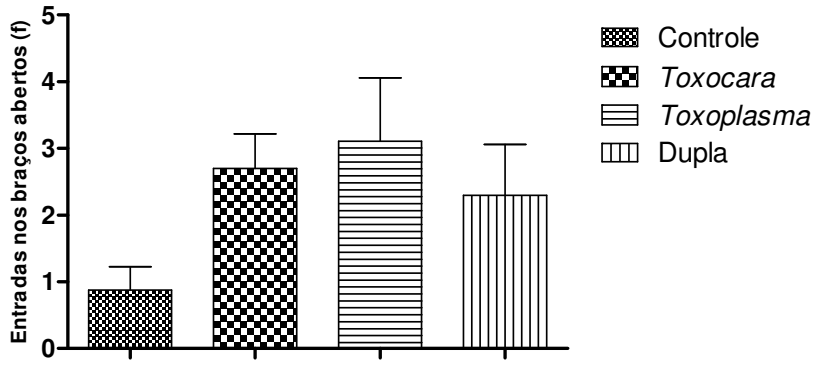


Gráfico 2 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços abertos(EBA), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi.

Não houve diferença estatística significante (p>0,05) na média da frequência de entrada nos braços fechados nos dias 40 e 70 pós-infecção, entre os grupos experimentais e o grupo controle (gráficos 3 e 4).

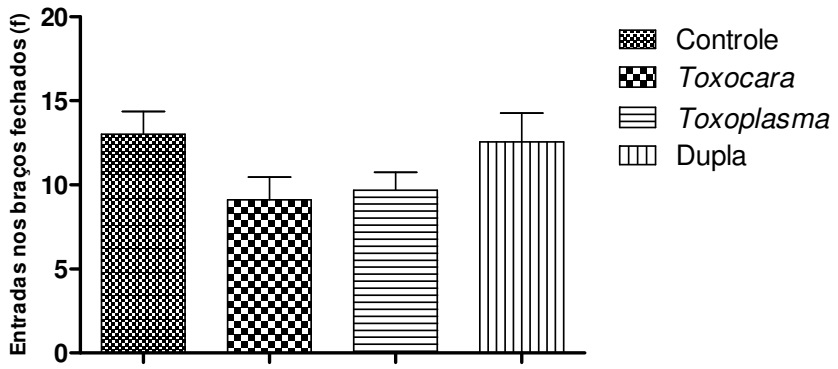


Gráfico 3 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços fechados (EBF), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi.

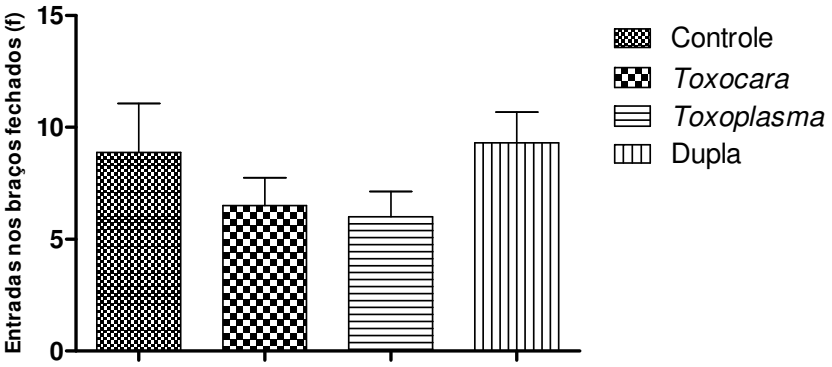


Gráfico 4 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* nos braços fechados (EBF), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi.

Quando avaliada a frequência de entradas no fundo dos braços abertos, o teste estatístico mostrou que os grupos infectados registraram aumento significativo de entradas aos 40 dias após infecção (controle: 0, *Toxocara*: 1,78±0,32, *Toxoplasma*: 2,90±0,46, Dupla infecção: 1,88±058), todavia, o mesmo não foi observado aos 70º dia após a infecção, conforme exposto nos gráficos 5 e 6.

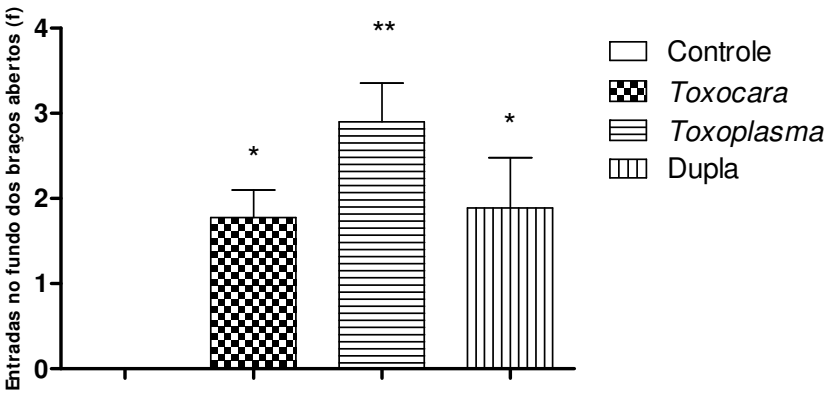


Grafico 5 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* no fundo dos braços abertos (FBA), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi. (*) $p<0,05$, (**) $p=0,01$.

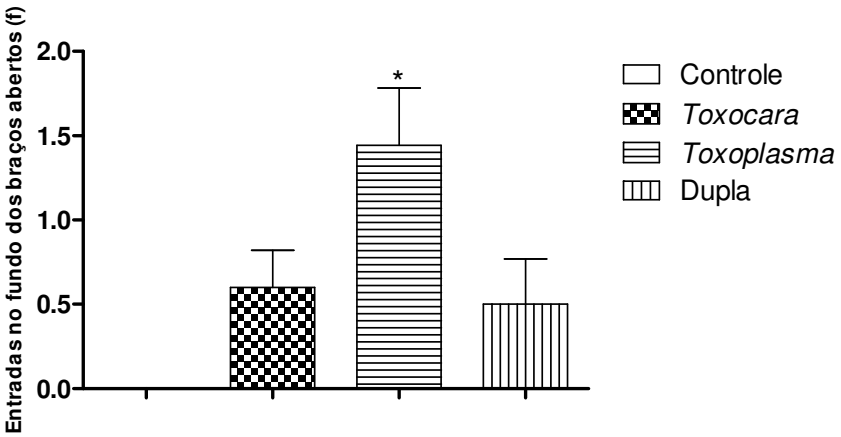


Gráfico 6 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* no fundo dos braços abertos (FBA), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi. (*) $p<0,05$.

Na avaliação das entradas no fundo dos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado, não se observou diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$) entre os grupos nos dois períodos de avaliação (gráficos 7 e 8).

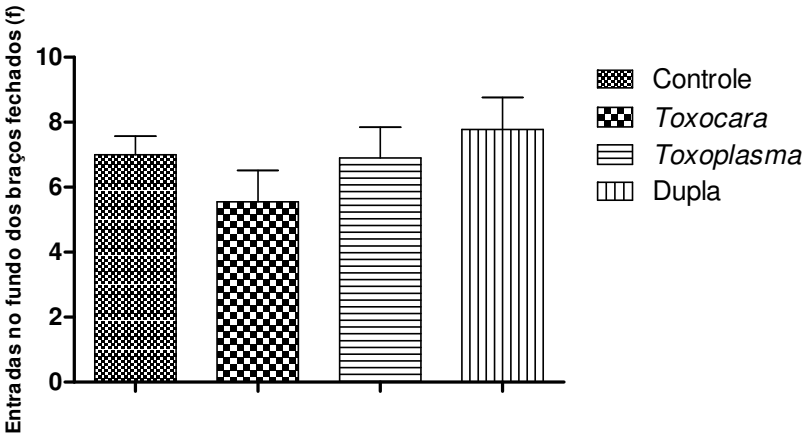


Gráfico 7 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* no fundo dos braços fechados (FBF), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi.

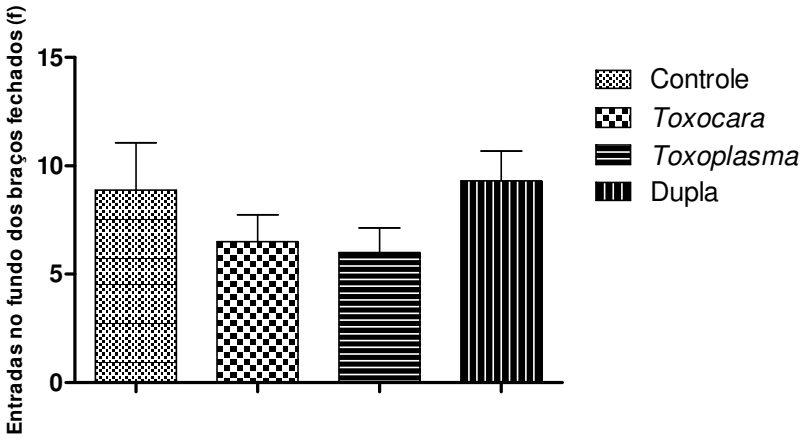


Gráfico 8 – Média e erro padrão da frequência de entradas de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis* no fundo dos braços fechados (FBF), avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi.

4.1.2 Tempo de permanência nos braços abertos.

Houve diferença estatisticamente significante (p<0,05) na permanência nos braços abertos no 40º dia após a infecção, ente os grupos *Toxocara* (39,22±13,50) e *Toxoplasma* (37,50±5,85) e o grupo controle (3±1,26), como apresentado no gráfico 9.

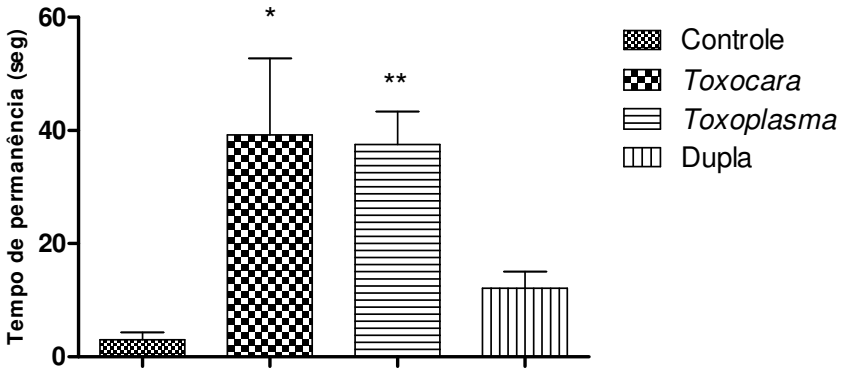


Gráfico 9 – Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços abertos (TBA) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi. (*) *p*<0,05 (**) *p*=0,01.

Após 70 dias, os animais infectados com *Toxoplasma gondii* apresentaram aumento estatisticamente significante na permanência nos braços abertos (24,33± 5,95; p<0,05) em relação aos animais do grupo controle (4,62 ± 1,81) conforme apresentado no gráfico 10.

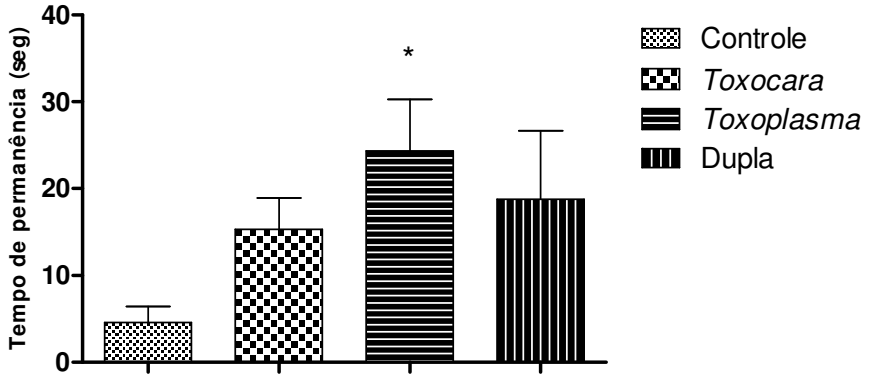


Gráfico 10 – Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços abertos (TBA) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi. (*) *p*=0,05.

4.1.3 Tempo de permanência nos braços fechados

Não houve diferença estatisticamente significativa (p>0,05) na permanência nos braços fechados nos dias 40 e 70 após a infecção, entre os grupos experimentais e controle (gráficos 11 e 12).

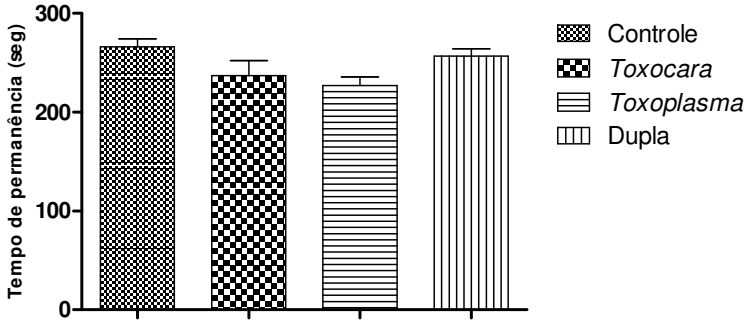


Gráfico 11 – Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços fechados (TBF) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi.

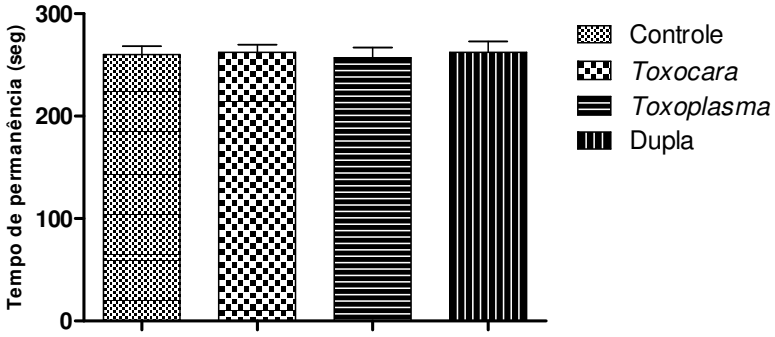


Gráfico 12 – Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* nos braços fechados (TBF) avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi.

4.1.4 Tempo de permanência no centro

A variável tempo de permanências no centro do Labirinto em Cruz Elevado não apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais avaliados e o controle nos períodos 40 e 70 dias após infecção, conforme dados apresentados nos gráficos 13 e 14.

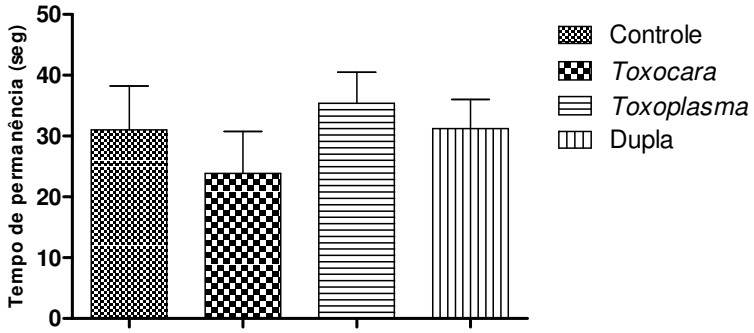


Gráfico 13 – Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no centro (TC) do Labirinto em cruz elevado aos 40 dpi.

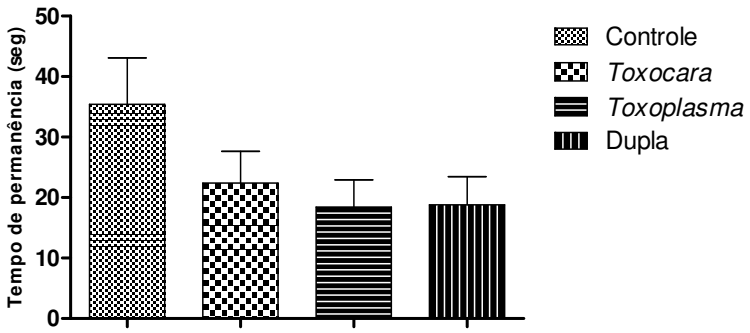


Gráfico 14 – Média e erro padrão do tempo de permanência de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi.

4.1.5 "Head dipping"

Não houve diferença estatisticamente significante no número de ''head dipping'' nos períodos avaliados neste experimento (gráficos 15 e 16).

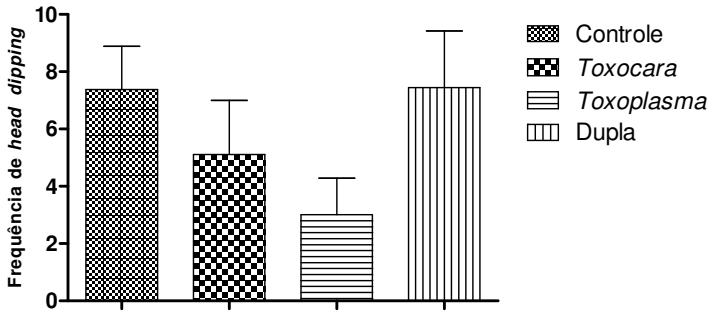


Gráfico 15 – Média e erro padrão da frequência de *head dipping* de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis*, avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 40 dpi.

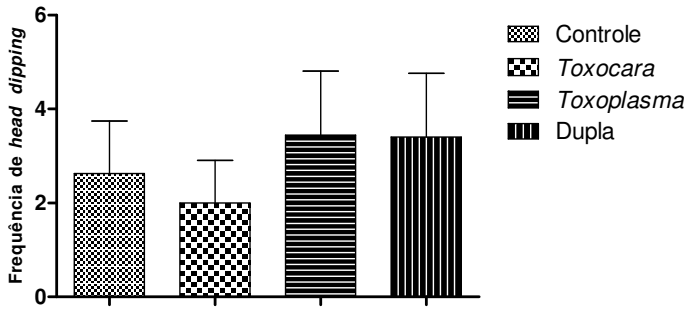


Gráfico 16 – Média e erro padrão da frequência de *head dipping* de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e ou *Toxocara canis*, avaliados no Labirinto em Cruz Elevado aos 70 dpi.

4.2 Quantificação de BDNF

Os gráficos 17 e 18 expressam a densidade óptica do soro dos animais observados no teste ELISA-BDNF nos períodos de 42 e 72 dias após infecção. O *n* dos grupos utilizado no presente teste não permitiu chegar à diferenças estatísticas significantes. O gráfico 19 apresenta a curva padrão da relação entre a densidade óptica observada nos soros dos ratos e a quantidade de BDNF. A curva padrao foi feita a partir de amostra de BDNF concentrada disponibilizada pelo kit BDNF-ELISA.

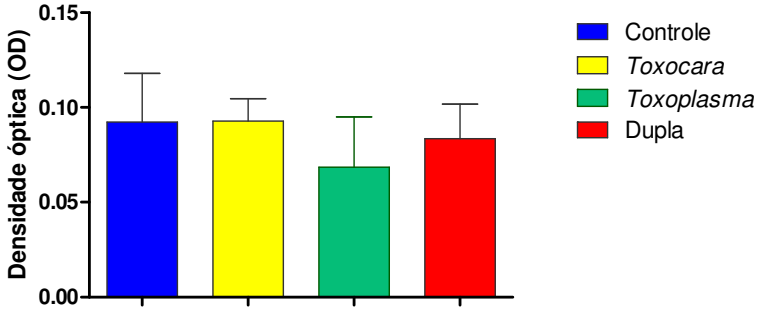


Gráfico 17 - Média e desvio padrão da densidade optica (DO) do soro de *Rattus norvegicus*, analisados por meio do kit BDNF-ELISA, dos grupos Controle (n=3), *Toxocara* (n=3), *Toxoplasma* e Dupla (n=3) aos 40 dpi.

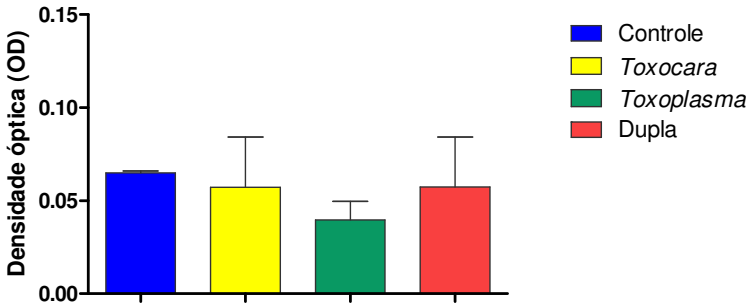


Gráfico 18 - Média e desvio padrão da densidade optica (DO) do soro de *Rattus norvegicus*, analisados por meio do kit BDNF-ELISA, dos grupos Controle (n=5), *Toxocara* (n=8), *Toxoplasma* (n=8) e Dupla (n=7) aos 70 dpi.

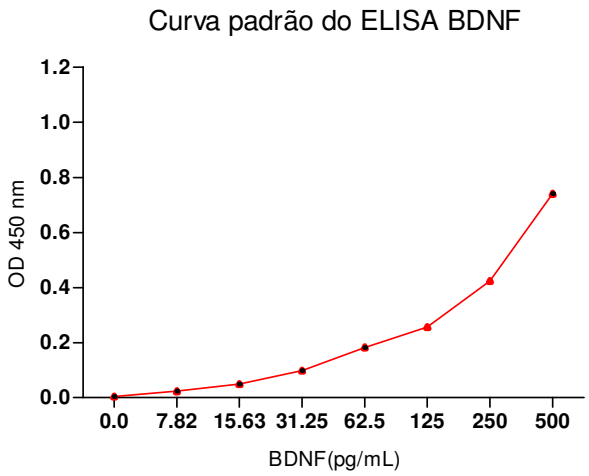


Gráfico 19 – Curva padrão da relação entre a quantidade de BDNF e a Densidade óptica observada no teste ELISA-BDNF.

4.3 Ciclo estral

A quantidade de fêmeas de cada grupo, nas quatro fases do período estral, está descrita na tabela 1 (40 dias) e tabela 2 (70 dias). A diferença apresentada no número de animais dos grupos entre os períodos avaliados deveu-se a insuficiência de material coletado para leitura do lavado. Optou-se por fazer a coleta apenas uma vez no dia para evitar o estresse do animail. Com 40 dias após a infecção, a maioria das fêmeas dos grupos controle (7/8), *Toxocara* (6/9) e

Toxoplasma (10/10) apresentavam-se entre os períodos diestro/metaestro. As fêmeas do grupo com infecção concomitante apresentaram-se em maior quantidade (6/10) na fase de estro.

Tabela 1 – Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle (n=08) e dos grupos infectados por *Toxocara canis* (n=09), *Toxoplasma gondii* (n=10) e infecção dupla (n=10) aos 40 dpi.

Grupos	Fase do ciclo estral			
	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro
Controle	1	0	1	6
Toxocara	2	0	3	4
Toxoplasma	5	0	5	0
Infecção Dupla	1	0	6	3

Aos 70 dias pós-infecção a maioria das fêmeas dos grupos controle (5/8), *Toxocara* (6/9) e *Toxoplasma* (7/10) e dupla infecção (6/10) apresentavam-se entre os períodos proestro/estro (tabela 2).

Tabela 2 – Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle (n=08) e dos grupos infectados por *Toxocara canis* (n=10), *Toxoplasma gondii* (n=10) e infecção dupla (n=10) aos 70 dpi.

Grupos	Fase do ciclo estral			
	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro
Controle	1	1	4	2
Toxocara	2	1	5	2
Toxoplasma	1	1	6	2
Infecção Dupla	3	1	5	1

4.4 Avaliação do comportamento em Campo Aberto (Actômetro)

4.4.1 – Variável Levantar nas patas dianteiras

Não houve diferença estatisticamente significante (p>0,05) quanto a variável levantar nas patas dianteiras nos dias 41 e 71 após infecção, entre os grupos experimentais e o grupo controle (gráficos 20 e 21).

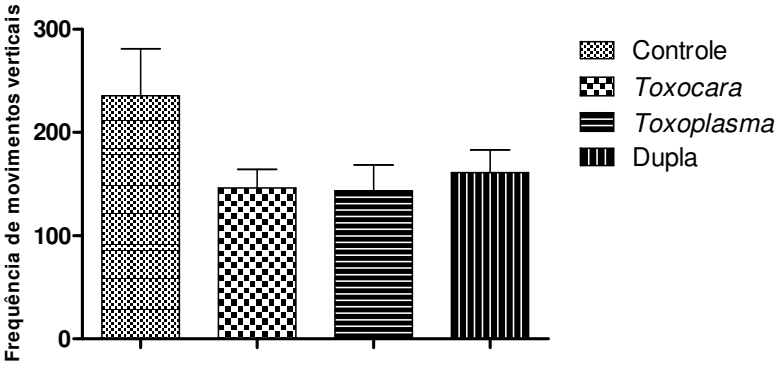


Gráfico 20 – Média e erro padrão dos movimentos verticais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis* no teste de atividade motora espontânea em campo aberto aos 41 dpi.

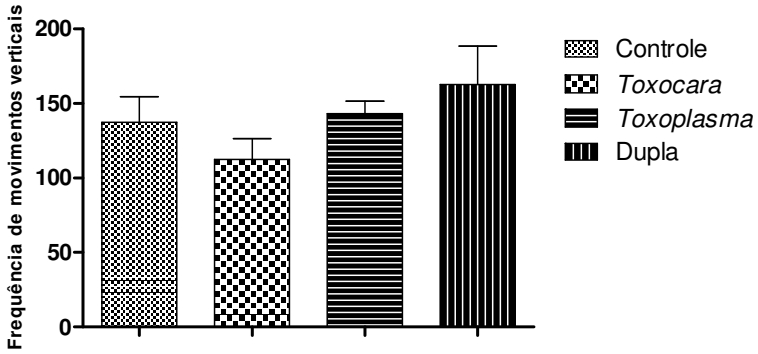


Gráfico 21 – Média e erro padrão dos movimentos verticais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* no teste de atividade morora espontânea em campo aberto aos 71 dpi.

4.4.2 – Variável Deambulação

Não houve diferença estatisticamente significaante quanto a variável deambulação nos dias 41 e 71 após infecção, entre os grupos experimentais e o controle (gráficos 22 e 23).

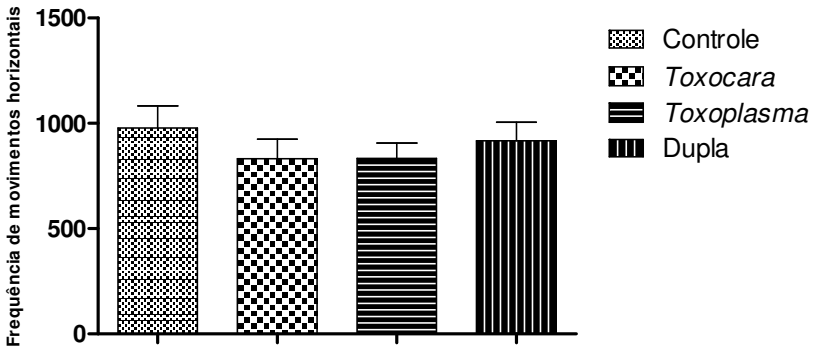


Gráfico 22 – Média e erro padrão dos movimentos horizontais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* no teste de atividade morora espontânea em campo aberto aos 41 dpi.

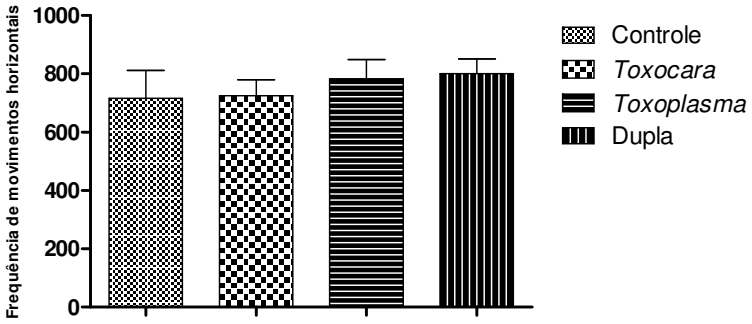


Gráfico 23 - Média e erro padrão dos movimentos horizontais de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis*, no teste de atividade morora espontânea em campo aberto aos 71 dpi.

4.4.3 – Tempo de imobilidade.

Não houve diferença estatisticamente significante (p>0,05) no tempo de imobilidade entre os grupos infectados e o grupo controle com 41 dias após infecção. Os valores referentes ao 41 e 71 dias estão representados na tabela 3. O gráfico 24 apresenta os valores referentes ao dia 71 após infecção, indicando menor tempo de imobilidade no grupo infectado por *Toxoplasma*. A tabela 3 apresenta a média, desvio padrão e erro pardrão nos dois períodos avaliados.

Tabela 3 - Média, desvio padrão e erro padrão do tempo de imobilidade em campo aberto aos 41 e 71 dias após infecção (*=p<0,05).

	Controle		*Toxocara*		*Toxoplasma*		Infecção dupla	
	41d	71d	41d	71d	41d	71d	41d	71d
Média	22,38	84,50	60,44	73,40	44,20	**34,67***	31,33	51,10
Desvio Padrão	14,50	41,72	51,34	36,78	28,27	28,50	28,46	35,94
Erro Padrão	5,12	14,75	17,11	11,63	8,93	9,50	9,48	11,37

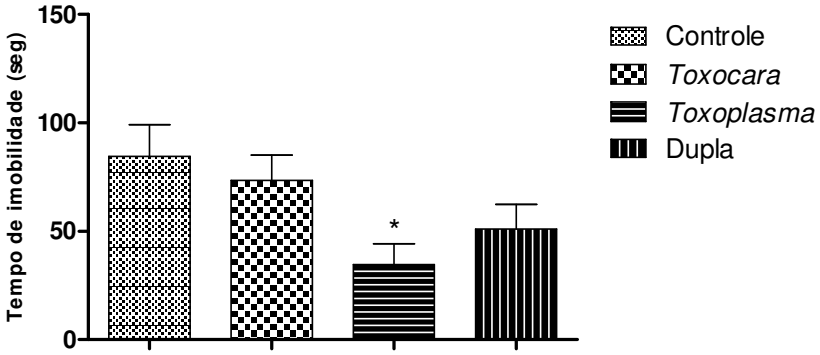


Gráfico 24 – Média e erro padrão do tempo de imobilidade de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis*, avaliados no teste de atividade motora espontânea em campo aberto aos 71 dpi. (*) *p*<0,05.

A média, desvio padrão e erro padrão das variáveis *grooming* e *pellets* fecais estão dispostos nas tabelas 4 e 5, respectivamente. Os dados analisados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para ambas as variáveis.

Tabela 4 - Média, desvio padrão e erro padrão do tempo de *grooming* em campo aberto aos 41 e 71 dias após infecção.

	Controle		*Toxocara*		*Toxoplasma*		Infecção dupla	
	41d	71d	41d	71d	41d	71d	41d	71d
Média	20,00	15,38	33,11	27,90	34,00	22,89	31,78	26,50
Desvio Padrão	15,55	11,93	12,15	12,93	24,39	16,59	20,37	17,60
Erro Padrão	5,49	4,21	4,05	4,05	7,71	5,53	6,79	5,56

Tabela 5 - Média, desvio padrão e erro padrão dos *pellets* recuperados de *Rattus norvegicus* de todos os grupos avaliados em campo aberto aos 41 e 71 dias após infecção.

	Controle		*Toxocara*		*Toxoplasma*		Infecção dupla	
	41d	71d	41d	71d	41d	71d	41d	71d
Média	1,37	0,25	0,88	1,00	0,10	0,33	0,55	0,70
Desvio Padrão	2,56	0,46	1,83	1,70	0,31	1,00	1,66	2,21
Erro Padrão	0,90	0,16	0,61	0,53	0,10	0,33	0,55	0,70

4.5 Ciclo estral

O lavado vaginal aos 41 dias pós-infecção mostrou predominância de fêmeas na fase proestro e estro nos grupos controle (5/8) e *Toxoplasma* (5/9). As fêmeas dos grupos infectados por *Toxocara* e infecção dupla apresentaram predominância na fase diestro e metaestro (tabela 6).

Tabela 6 – Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle (n=08) e dos grupos infectados por *Toxocara canis* (n=10), *Toxoplasma gondii* (n=9) e infecção dupla (n=10) aos 41 dpi.

Grupos	Fase do ciclo estral			
	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro
Controle	3	2	3	0
Toxocara	3	0	2	4
Toxoplasma	3	0	5	1
Infecção Dupla	3	0	3	4

Aos 71 dias pós-infecção, a maioria dos animais apresentaram-se nas fases proestro e estro, conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7 – Ciclo estral de fêmeas de *Rattus norvegicus* do grupo controle (n=08) e dos grupos infectados por *Toxocara canis* (n=10), *Toxoplasma gondii* (n=10) e infecção dupla (n=10) aos 71 dpi.

Grupos	Fase do ciclo estral			
	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro
Controle	1	0	4	3
Toxocara	2	1	5	2
Toxoplasma	1	1	6	2
Infecção Dupla	3	1	5	1

4.6 Cortes histopatológicos corados com Hematoxilina/Eosina (HE)

4.6.1 Grupo *Toxocara canis*

Pode-se observar presença de larvas nos cortes histológicos de todos os animais infectados por *Toxocara canis* (Figura 6). As larvas apresentavam-se dispersas em todas as regiões do tecido cerebral.

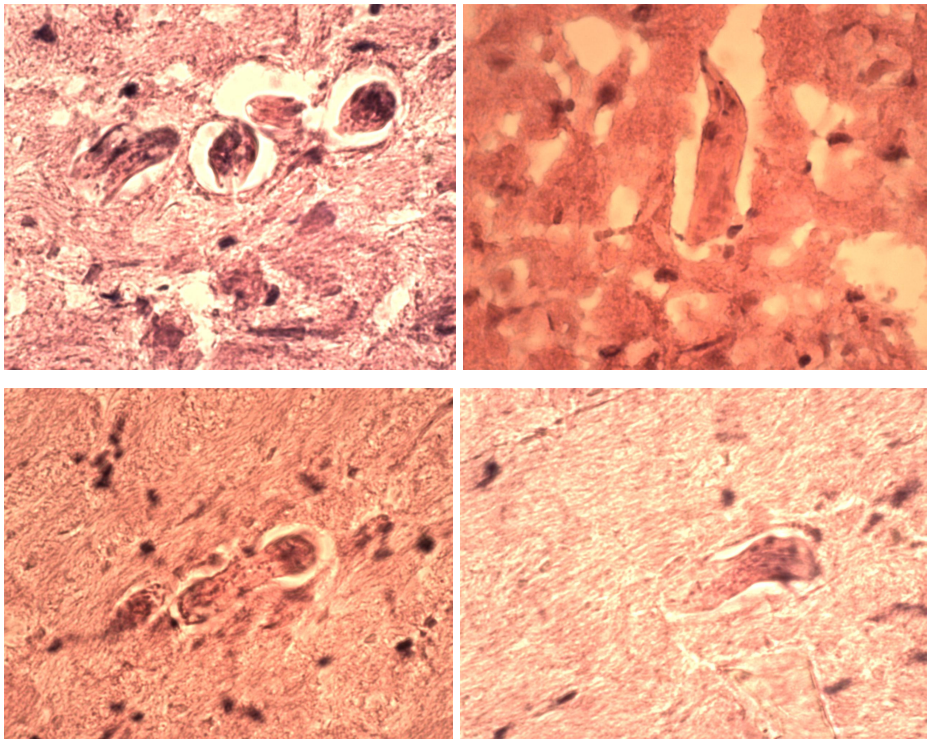


Figura 6: Cortes histológicos de cérebros de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxocara canis*, objetiva de 40x.

4.6.2 Grupo *Toxoplasma gondii*

Os cortes histológicos do grupo infectado por *Toxoplasma gondii*, incluindo a região do hipocampo, revelaram a presença de cistos (Figura 7).

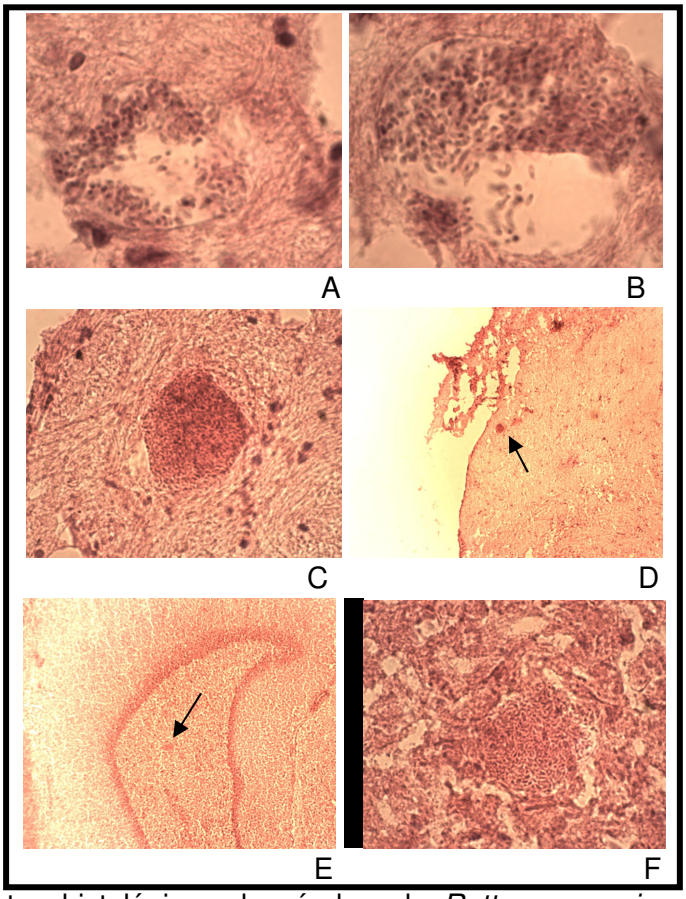


Figura 7 - Cortes histológicos de cérebro de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii*. A e B aumento de 1000x, C=aumento de 400x, D=aumento de 40x, E=aumento de 40x e F=aumento de 400x.

4.7 Vermelho Congo – Luz Polarizada

Para a coloração de Vermelho de Congo, observada em luz polarizada, não houve presença de placas amiloides nos animais dos grupos controle, *Toxocara* e Infecção Dupla, entretanto, quando observado o grupo infectado por *Toxoplasma gondii*, metade dos animais apresentavam estruturas na cor verde

maçã, quando observadas na luz polarizada, indicativo da presença de placas amiloides. A leitura foi feita somente das lâminas que apresentavam a região do hipocampo

A figura 8 apresenta vaso cerebral corado com Vermelho de Congo evidenciando parede com coloração vermelho tijolo, porém ao observar sob luz polarizada, não apresentou coloração verde maçã (Figura 9)

4.7.1 Grupo Controle

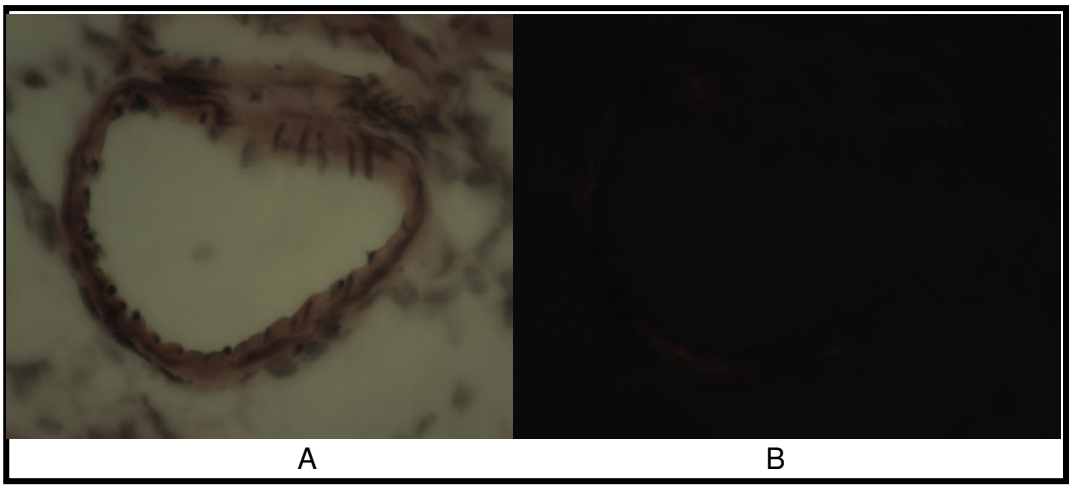


Figura 8 - Corte histológico de tecido cerebral de *Rattus norvegicus* sem infecção, corado com Vermelho de Congo evidenciando parede de vaso cerebral. A=luz normal e B=Luz polarizada.

4.7.2 Grupo *Toxoplasma gondii*

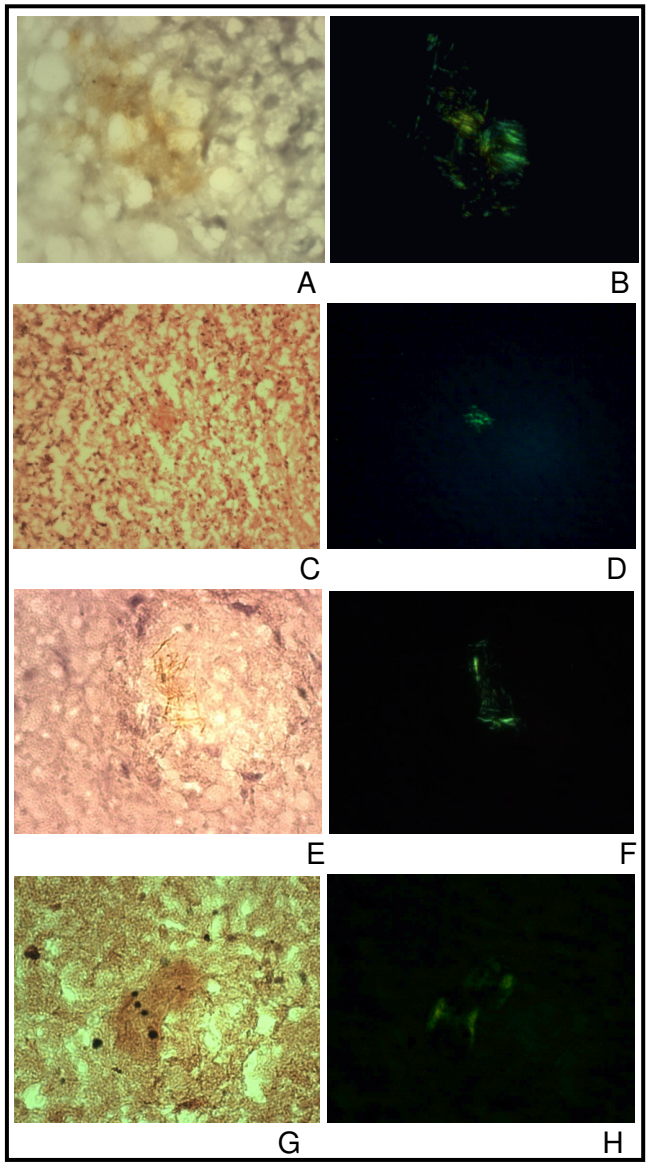


Figura 9 - Corte histológico de tecido cerebral de *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii*, corado com Vermelho de Congo. A, C, E e G=luz normal e B, D, F e H=Luz polarizada.

4.8 Avaliação da memória espacial e aprendizado em Labirinto terrestre de Barnes

Na avaliação da memória espacial no Labirinto Terrestre de Barnes, todos os grupos apresentaram diminuição no tempo para encontrar a toca e no tempo de entrada (gráficos 25 e 26). Entretanto, os grupos infectados por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis* apresentaram diminuição significante no tempo para localizar a toca (*Toxoplasma* = 95% IC -240,4 to 15,40 p<0,05; *Toxocara* = 95% IC -239,7 to 16,15, p<0,05) e entrar nela (*Toxoplasma* = 95% IC -315,9 to -45,70 p<0,001; *Toxocara* = 95% IC -286,2 to 16,07, p<0,01), quando desafiados com urina de gato após 72 horas após períodos de treinos ao serem comparados com o grupo controle (gráficos 25 e 26).

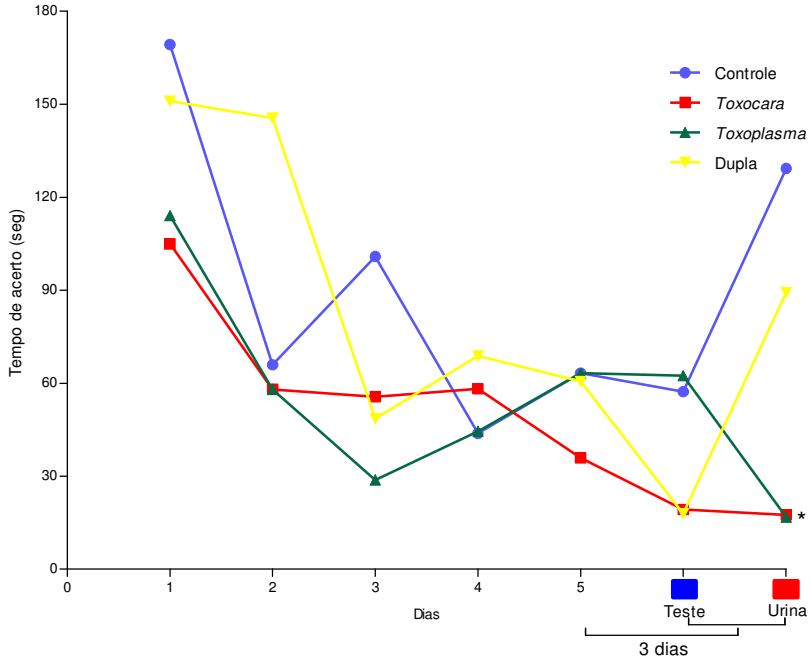


Gráfico 25 – Avaliação da memória espacial e aprendizado de *Rattus norvegicus* na fase crônica da infecção por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* no Labirinto de Barnes e desafiado com urina de gato 72h após treinos. *=p<0,05 comparado com o grupo controle.

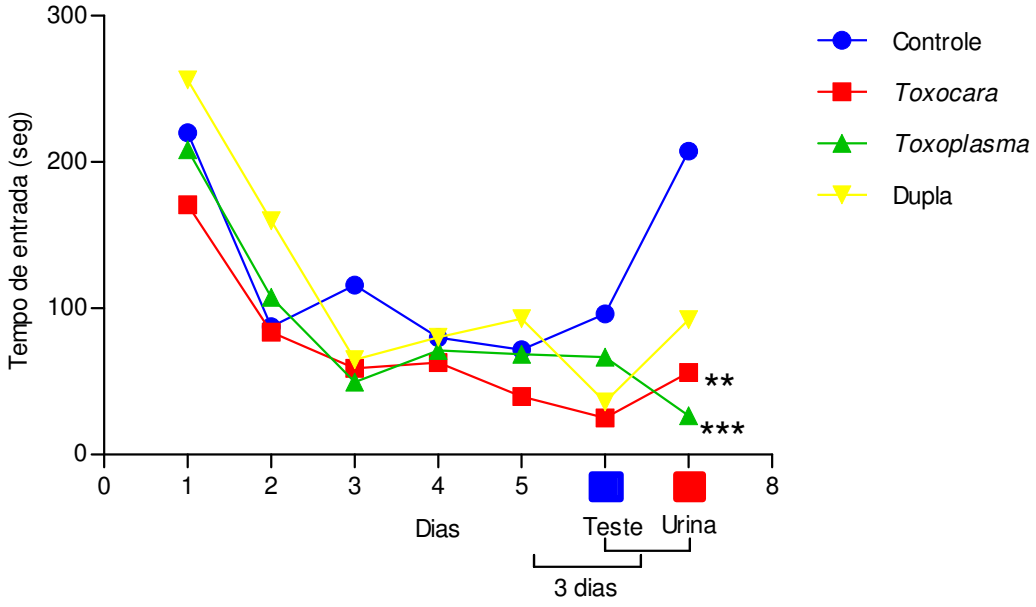


Gráfico 26 – Avaliação da memória espacial e aprendizado de *Rattus norvegicus* na fase crônica da infecção por *Toxoplasma gondii* e/ou *Toxocara canis,* no Labirinto de Barnes e desafiado com urina de gato 72h após treinos (**p=0,01 e ***p=0,001 comparado com grupo controle)

4.9 Digestão ácida dos órgãos para recuperação de larvas de *Toxocara canis*

Encontrou-se larvas em pelo menos um órgão de todos os animais dos grupos infectados por *Toxocara canis* e com infecção dupla. Não encontrou-se larvas de *Toxocara canis* nas vísceras dos animais do grupo controle.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No processo de coevolução desenvolvido entre parasitos e hospedeiros diversas adaptações foram selecionadas, especialmente quando resultaram em elevação da taxa de reprodução das espécies parasitárias[104].

Desde 1972, com a publicação de Holmes & Bethel[105] descrevendo alterações de comportamento de crustáceos hospedeiros intermediários do acantocéfalo *Polymorphus paradoxos* que aumentavam a probabilidade de sua predação por patos, que são hospedeiros definitivos desses helmintos e, consequentemente, elevavam a taxa de reprodução do parasito, a comunidade científica teve sua atenção despertada para esse fenômeno, que ficou conhecido como "hipótese de manipulação". Em 1991 Combes[4], analisando alterações de comportamento de hospedeiros infectados e parasitos ao longo de seu ciclo evolutivo, conceituou "favorecimento" como um processo etológico adaptativo que modifica o posicionamento espacial e temporal do parasito e de seu alvo (hospedeiro) de forma a aumentar a probabilidade de encontro entre ambos. A consequência final seria a facilitação do processo reprodutivo do parasito.

Exemplos melhores da ocorrência da "hipótese de manipulação" do comportamento de hospedeiros parasitados são representados por parasitos cuja transmissão pode acontecer por meio da cadeia alimentar, quando formas imaturas são albergadas por hospedeiros paratênicos ou intermediários que as transferem ao hospedeiro definitivo, onde completarão seu ciclo. *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis* pertencem a essa categoria. Estes parasitos apresentam típico caráter zoonótico, infectando com frequência roedores e pequenos mamíferos[106] e podem ser responsáveis por infecções de seres humanos, por vezes concomitantes[107,108], variando desde formas assintomáticas até quadros com elevada gravidade.

A maioria dos estudos acerca da biologia e história natural de parasitoses considera a ocorrência de infecções de hospedeiros por uma única espécie de parasito; entretanto, em condições naturais é comum a concomitância de duas ou mais espécies de parasitos coabitando no mesmo hospedeiro[109,110,111], podendo resultar em interações que diferem da simples somatória dos efeitos isolados de cada espécie. O presente trabalho aborda a ocorrência de alterações na ansiedade, aprendizado e memória espacial de roedores infectados concomitantemente por duas espécies de parasitos (*Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis*) cujos efeitos, isoladamente, na resposta imunitária do hospedeiro apresentam aparente conflito, com estímulo predominante do tipo Th1 no caso de *Toxoplasma gondii*[35] e Th2 na infecção por *Toxocara canis*[36].

Fêmeas de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectadas por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* foram avaliadas no labirinto em cruz elevado e apresentaram diferenças entre as variáveis comportamentais nos dois períodos avaliados no presente estudo. Levando em consideração os índices pré-estabelecidos de ansiedade: quanto maior a ansiedade, menor a percentagem de entrada nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos[73,101], pode-se sugerir que, para este experimento, a infecção por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis* exerceu efeito ansiolítico nos ratos infectados. No entanto, o grupo com infecção concomitante, quando avaliado o tempo gasto nos braços abertos do labirinto, despendeu tempo semelhante aos apresentados pelo grupo controle, sugerindo modulação de resposta na vigência de infecção concomitante. Esses dados concordam com informações obtidas por outros autores que verificaram alterações de comportamento em fêmeas de *Rattus norvegicus* infectadas por *Toxocara* sp. e/ou *Toxoplasma gondii* no Labirinto em Cruz Elevado e em campo aberto[5,27,112]. Além disso, a modulação no comportamento de roedores com infecção dupla

observada neste experimento corrobora os achados anteriores de Corrêa et al.[28] e Queiroz et al.[112].

Diversos estudos questionam o uso de fêmeas para análise de alteração comportamental, devido à influência do ciclo estral nas variáveis estudadas[70,113]. Entretanto, discrepâncias entre autores têm sido observadas[114,115].

Ratas gastam mais tempo nos braços abertos do LCE em comparação aos ratos, indicando menor nível de ansiedade nas fêmeas[113]. Essa diferença, segundo vários autores, é atribuída a variação de hormônios sexuais presentes no ciclo estral[116,117,118]. Porem, Pellow et al.[96] apresentaram dados discordantes dos autores acima, pois verificaram que ratos de ambos os sexos tinham frequência reduzida e menor tempo de permanência nos braços abertos do aparelho, sugerindo aumento na ansiedade para ambos os sexos.

Nasello et al.[71] observaram alterações comportamentais em machos e fêmeas de *Rattus norvegicus* quando avaliados na presença de luz, entretanto, quando avaliados na ausência de luz, somente as fêmeas apresentaram maior frequência de entradas nos braços abertos do LCE, sugerindo influência da luminosidade no comportamento e não do ciclo estral.

Segundo Albonetti e Farabollini[119], ausência de diferenças nas entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE, observadas para ambos os sexos, pode indicar que a ansiedade não está na base das mudanças de comportamento dependente do sexo.

Santos et al.[27] avaliando comportamento e força muscular de machos e fêmeas infectados por *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*, concluíram que ambos os sexos apresentavam alterações comportamentais e diminuição da força muscular.

No presente estudo, duas horas antes da avaliação comportamental, foi coletada secreção vaginal das fêmeas para avaliar a fase do ciclo estral, utilizando a técnica de Marcondes et al.[120]. No dia do primeiro teste no LCE, a maioria das

fêmeas apresentavam-se nas fases diestro e metaestro quando segundo Diaz-Veliz et al.[121], mostram-se mais ansiosas do que nas fases de proestro e estro. No entanto, os grupos das fêmeas infectadas observadas neste experimento apresentaram-se menos ansiosas quando comparadas ao grupo controle na fase aguda da infecção. Todavia o mesmo não ocorreu na fase crônica para os animais infectados por *Toxocara canis*. Esse fato pode ser explicado pela migração das larvas do cérebro para outros locais[68] ou pela transitoriedade na alteração do comportamento pelo parasito já observada por outros autores[5,122].

Um dado que deve-se levar em consideração é que, a maioria dos trabalhos que questionam o uso de fêmeas apresentam dados da influência de hormônios sexuais na ansiedade e medo de fêmeas não infectadas[116,117,118,123], porém, estudos comportamentais evidenciaram alterações na ansiedade de fêmeas de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectadas, sugerindo que a presença do parasito tem papel importante na alteração comportamental das fêmeas, independente da fase do ciclo estral[5,27,112].

Trabalhos experimentais mostram que ratos infectados por *Toxoplasma gondii* não só apresentam diminuição do medo, mas também atração pela urina do predador felino[1,17,124,125]. Acredita-se que estas alterações são manipuladas pelo parasito para manter o ciclo sexuado que ocorre exclusivamente no intestino de felinos.

O conhecimento acerca dos mecanismos utilizados pelo parasito para manipulação do comportamento do hospedeiro não está bem esclarecido. Dois aspectos são levados em conta: a expressão de neuromoduladores liberados pelo hospedeiro frente à infecção e a localização do parasito no tecido nervoso. *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis* têm preferência pelo sistema nervoso central, principalmente em áreas relacionadas à aprendizagem, memória, ansiedade, coordenação e controle de movimentos voluntários[29].

Dantzer et al.[126] confirmaram o papel de citocinas pró-inflamatórias relacionadas com doenças comportamentais, tais como: depressão da atividade locomotora, diminuição da exploração e redução no aprendizado e na memória de camundongos. Além disso, eles relatam a ligação entre o aumento de citocinas no cérebro, principalmente IL-1β, e prejuízo no aprendizado e memória, descrevendo como o aumento na produção de citocinas interfere com o armazenamento da memória dependente do hipocampo.

Em camundongos Balb/C experimentalmente infectados por *Toxocara canis*, altos níveis de IL-5, IL-10, IFN-γ e iNOS no cérebro são detectados aos 35 e 42 dias após infecção[127]. Esses dados corroboram a ideia de que citocinas podem estar envolvidas no mecanismo de alteração do comportamento, pois o período em que ocorre a elevação dessas citocinas coincide com alterações comportamentais observadas em camundongos infectados[29]. No presente estudo, observou-se alterações comportamentais nos roedores infectados por *Toxocara canis* aos 40 dias após a infecção, confirmando os achados dos autores acima citados, entretanto, para esse experimento não é possível confirmar relação entre níveis de citocinas e alterações comportamentais, pois foram utilizados ratos e não camundongos e, além disso, não foram verificados os níveis de citocinas envolvidas na infecção dos ratos nos dois períodos da infecção.

Canteras et al.[128], avaliaram alterações no comportamento de fuga e expressão de Fos, proteína utilizada para mapeamento da atividade funcional do cérebro, de *Rattus norvegicus* frente a um predador felino e concluíram que roedores expostos ao predador durante dez minutos apresentaram quantidade maior da proteína Fos na região do núcleo premamilar dorsal. Além disso, eles observaram que ao lesionar quimicamente a região estudada, os animais apresentaram diminuição no comportamento de fuga, entretanto, aumentaram o comportamento exploratório.

Outro fator que chama a atenção de pesquisadores é a relação entre o aumento das ramificações dendríticas dos neurônios de amígdala basolateral, bem como o aumento de corticosterona com o aumento da ansiedade[129,130,131,132,133,134,135].

Mitra et al.[69], postularam que *Toxoplasma gondii* altera tanto a produção de corticosterona quanto a plasticidade dos neurônios na região da amígdala basolateral. Eles concluíram que os animais infectados apresentavam diminuição de corticosterona no soro e as ramificações neuronais da amígdala basolateral eram menores quando comparadas com o grupo controle.

Os mesmos autores mostraram ainda que as alterações apresentadas no tamanho das ramificações neuronais ocorriam apenas na região da amígdala basolateral, pois ao investigarem regiões vizinhas eles não observaram alterações, concluindo que a infecção não representa indução genérica na atrofia dos neurônios.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem papel importante na plasticidade e conectividade neural. Diferenças na expressão de BDNF no cérebro de camundongos estão associadas a diversos transtornos comportamentais[87].

YongHua et al.[95], observaram aumento na expressão de proteínas e mRNA de BDNF no tecido cerebral de ratos na fase crônica da infecção por *Toxoplasma gondii*.

No presente estudo, foi avaliada a concentração de BDNF no soro dos grupos infectados por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* em dois momentos do experimento e não se observou diferença estatisticamente significante entre a quantidade de BDNF no soro dos animais, nos dois períodos avaliados, quando comparado ao grupo controle. A discordância entre o trabalho de YongHua et al.[95] e o presente estudo pode estar relacionada com o tipo de material avaliado[87], a idade e sexo dos animais[136].

No que se refere a memória espacial e aprendizado, não foi observado déficit em nenhuma destas duas variáveis estudadas no presente trabalho. Alguns autores sugerem que a infecção por *Toxocara canis* pode retardar o aprendizado e memória de roedores, contudo os níveis de prejuízo raramente mostram-se estatisticamente significantes[14,15,137,138]. É possível que, no momento da avaliação do aprendizado e memória, as larvas não estivessem posicionadas em locais no cérebro, como por exemplo, no telencefalo[139] e cerebelo[140], importantes áreas associadas com aprendizado, memória, coordenação e controle dos movimentos volutários[29].

Os cortes histológicos dos cérebros das ratas mostraram que larvas de *Toxocara canis* e/ou cistos de *Toxoplasma gondii* estavam bem distribuídos no sistema nervoso central dos animais, principalmente nas regiões que compreendem o hipocampo. Esses dados também foram observados por Vyas et al.[1], que verificaram, por meio de imagem bioluminescente *in vivo*, maior densidade de cistos de *Toxoplasma gondii* na região da amigdala de roedores, região relacionada com memória do medo[141].

Recentes estudos indicam que o parasito, além de “manipular” o comportamento e influenciar na memória e aprendizado do hospedeiro, pode também atenuar a aversão inata de ratos para urina de gatos tornando-a um atrativo. Porém não há interferência no comportamento social e de acasalamento[17,142]. Estes achados concordam com a hipótese da manipulação comportamental que prediz que parasitos alteram somente comportamentos benéficos para sua transmissão, enquanto que outros comportamentos permaneceriam intactos[1,31,143].

Esse evento foi observado também nos animais testados no Labirinto de Barnes quando desafiados com urina de gato. As variáveis tempo para encontrar a toca e tempo para entrar na toca com urina de gato, tiveram diminuição significante

para os grupos *Toxocara* e *Toxoplasma*, quando comparados com o grupo controle. O mesmo não aconteceu com os animais com infecção dupla, que apresentaram tempo igual ao controle. Esse evento tem se mostrado presente em alguns trabalhos comportamentais utilizando animais com dupla infecção, sugerindo que a presença de um parasito possa inibir a presença do outro.

A maioria dos estudos experimentais, referentes à manipulação comportamental, investigou efeitos da infecção única no comportamento do hospedeiro. Na natureza, entretanto, os hospedeiros com frequência estão expostos à infecção por várias espécies de parasitos[144]. Havendo interesses em comum, a presença de um segundo parasito, teoricamente, beneficiaria ambos os parasitos, devido ao compartilhamento dos custos da manipulação, tornando-a mais eficiente e, consequentemente, aumentando a transmissão[145]. Em contraste a esse cenário, na ocasião em que houver infecção por dois parasitos com objetivos distintos, a “manipulação” do comportamento do hospedeiro, por um dos parasitos seria “sabotada” pelo outro.

Hafer e Milinski[146] concluíram que essa “sabotagem” ocorre na infecção por parasitos da mesma espécie, porém em fase larvária diferente. Eles mostraram que copepodes da espécie *Macrocyclops albidus*, quando infectadas pelo parasito *Schistocephalus solidus*, um cestódeo, apresentam aumento na atividade natatória, tornando-as presas fáceis para o predador. Esse evento foi visualizado apenas nos hospedeiros que apresentavam larvas prontas para infectar, entretanto, quando o hospedeiro era infectado em dois momentos, apresentando fases larvares infectantes e não infectantes, as não infectantes “sabotavam” a alteração do comportamento do hospedeiro. Porém, no momento em que essas larvas se tornaram infectantes, o processo de “manipulação” tornava-se evidente.

No presente estudo, é visível a manipulação do comportamento do hospedeiro por ambos os parasitos, quando a infecção acontece isoladamente,

contudo, quando a infecção é concomitante, observa-se “modulação” no comportamento dos roedores fazendo-os comportarem-se de forma semelhante ao grupo controle. O que não é possível de se responder nesse trabalho é, qual parasito está inibindo o outro, sendo que ambas as espécies estão prontas para infectar o hospedeiro e ambas as infecções ocorreram ao mesmo tempo. Faz-se necessário novos trabalhos avaliando alterações comportamentais com dupla infecção, porém com início da infecção ocorrendo em dias diferentes.

Outro fator importante é a associação entre infecção por *Toxoplasma gondii*[147,148] ou *Toxocara* sp.[149,150] com doenças neuropsiquiátricas, tais como, doença de Alzheimer, Parkinson e esquizofrenia. Os mecanismos pelos quais ambos os parasitos levam a essas mudanças estão longe de serem elucidados. Ao longo dos anos, grande número de pesquisas abrangendo diferentes aspectos da investigação (sorológico, farmacológicos, epidemiológica e comportamental) foram realizadas com objetivo de estabelecer associação etiopatogenetica entre infecção por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis* com desenvolvimento de alterações comportamentais e distúrbios neuropsiquiátricos[147,149,150].

Estudos mostram relação entre infecção por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis* com doença de Alzheimer e esquizofrenia[151,152,153], entretanto, esses dados devem ser avaliados com bastante cautela, pois a maioria dos trabalhos toma como base presença ou ausência de antígenos anti-*Toxoplasma* ou anti-*Toxocara* em indivíduos com doenças neuropsiquiátricas, não sendo possível avaliar se a infecção ocorreu antes ou depois do desenvolvimento dessas doenças.

Aglomerados de peptídeos βA, localizados no sistema nervoso central, principalmente na região hipocampal, têm sido associados como importante marcador para doença de Alzheimer[154]. Os peptídeos βA facilitam a produção de oxiradicais, podendo ser diretamente tóxicos para os neurônios e células da glia,

por agirem na peroxidação lipídica da membrana celular, desregulando a homeostase do cálcio[155,156,157].

Fan et al.[158] observaram presença de placas βA em camundongos experimentalmente infectados com baixas doses de ovos de *Toxocara* sp.. O mesmo não foi encontrado no presente estudo, quando observados os cortes do tecido cerebral dos roedores infectados por *Toxocara canis*. Somente foram encontradas placas βA no grupo infectado por *Toxoplasma gondii*. Esses dados são importantes para auxiliar na correlação das doenças neuropsiquiátricas e infecção por *Toxoplasma gondii*. Contudo, pesquisas mais aprofundadas são necessárias para elucidar os mecanismos que levam a essas alterações.

Em síntese o presente trabalho, ao analisar alterações de comportamento em roedores submetidos concomitantemente a infecção por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis*, procurou reproduzir experimentalmente situação que provavelmente é frequente em condições naturais. Os resultados encontrados reforçam indícios já assinalados em trabalhos anteriores[28,112] que mostraram a possibilidade de modulação da resposta comportamental na vigência de infecção concomitante por esses parasitos.

O desenho experimental utilizado no presente trabalho, todavia, optou por realizar ambas as infecções ao mesmo tempo, situação que nem sempre ocorrerá em condições naturais. Os trabalhos anteriores que também observaram ocorrência de modulação na resposta comportamental em infecções concomitantes de roedores por *Toxoplasma gondii* e *Toxocara canis*[28,112] igualmente efetuaram ao mesmo tempo as inoculações experimentais. Novos experimentos, alternando o momento de inoculação experimental dos parasitos, poderão fornecer informações importantes acerca da modulação da resposta comportamental em hospedeiros infectados por mais de uma espécie de parasito.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Para esse estudo, pode-se concluir que:

a) *Rattus norvegicus* infectados por *Toxocara canis* e/ou *Toxoplasma gondii* apresentaram-se menos ansiosos aos 40 dias após infecção, porém apenas o grupo infectado por *Toxoplasma gondii* apresentou alteração na ansiedade após 70 dias da infecção;

b) Cistos de *Toxoplasma gondii* e larvas de *Toxocara canis* estavam presentes em todos os cortes do cérebro de *Rattus norvegicus* experimentalmente intectados;

c) Infecção concomitante por *Toxocara canis* e *Toxoplasma gondii* mostrou modulação na ansiedade e aversão a urina de gato de *Rattus norvegicus* quando avaliados no Labirinto em Cruz Elevado e Labirinto Terrestre de Barnes;

d) Infecção por *Toxocara canis* ou *Toxoplasma gondii* reduziu a aversão de fêmeas de *Rattus norvegicus* para urina de gato;

e) *Rattus norvegicus* infectados por *Toxoplasma gondii* apresentaram placas beta-amiloide (βA) nos cortes histológicos do sistema nervoso central em 50% dos animais avaliados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1 - Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Apr 10;104(15):6442-7.

2 – Biron DG, Marché L, Ponton F, Loxdale HD, Galéotti N, Renault L, et al. Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. Proc Biol Sci. 2005 Oct 22;272(1577):2117-26.

3 - Webster JP. Rats, cats, people and parasites: the impact of latente toxoplasmosis on behaviour. Microbes Infect. 2001 Oct;3(12):1037-45.

4 – Combes C. Ethological aspects of parasite transmission. Am Natural. 1991;138:866-80

5 - Chieffi PP, Aquino RT, Pasqualotti MA, Ribeiro MC, Nasello AG. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis* larvae. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010 Sep-Oct;52(5):243-6.

6 - Chieffi PP, Aquino RT, Paschoalotti MA, Ribeiro MC, Nasello AG. Muscular strength decrease in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009 Mar-Apr;51(2):73-5.

7 - Lamberton PH, Donnelly CA, Webster JP. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. Parasitology. 2008 Sep;135(10):1143-50.

8 - Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. Schizophr Bull. 2007 May;33(3):752-6.

9 – Lion S, van Baalen M, Wilson WG. The evolution of parasite manipulation of host dispersal. Proc Biol Sci. 2006 May 7;273(1590):1063-71.

10 – Skallová A, Kodym P, Frynta D, Flegr J. The role of dopamine in *Toxoplasma*-induced behavioural alterations in mice: na ethological and ethopharmacological study. Parasitology. 2006 Nov;133(Pt 5):525-35.

11 – Seppälä O, Karvonen A, ET Valtonen. Parasite-induced change in host behavior and susceptibility to predation in an eye fluke-fish interaction. Anim Behav. 2004, 68:257-63.

12 - Thomas F, Ulitsky P, Augier R, Dusticier N, Samuel D, Strambi C, et al. Biochemical and histological changes in the brain of the cricket *Nemobius sylvestris* infected by the manipulative parasite *Paragordius tricuspidatus* (Nematomorpha). Int J Parasitol. 2003 Apr;33(4):435-43.

13 - Thomas F, Schimidt-Rhaesa A, Martin G, Manu C, Durand P, Renaud F. Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial host?. J Evol Biol 2002;15:356-61.

14 - Cox DM, Holland CV. Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. J Helminth. 2001;75:33-41.

15 - Cox DM, Holland CV. The influence of mouse strain, infective dose and larval burden in the brain on activity in *Toxocara*-infected mice. J Helminth. 2001;75:23-32.

16 - Havlícek J, Gasová ZG, Smith AP, Zvára K, Flegr J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. Parasitology. 2001 May;122(Pt 5):515-20.

17 - Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Proc Biol Sci. 2000 Aug 7;267(1452):1591-4.

18 - Poulin R. Manipulation of host behaviour by parasites: a weakening paradigm? Proc Biol Sci. 2000 Apr 22;267(1445):787-92.

19 - Cox DM, Holland CV. The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. Parasitology. 1998 Jun;116 (Pt 6):579-94.

20 - Poulin R. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. Int J Parasitol. 1995 Dec;25(12):1371-83.

21 - Donovick PJ, Burright RG. The consequences of parasitic infection for the behavior of the mammalian host. Environ Health Perspect. 1987 Aug;73:247-50.

22 - Hay J, Arnott MA, Aitken PP, Kendall AT. Experimental toxocariasis and hyperactivity in mice. Z Parasitenkd. 1986;72(1):115-20.

23 - Burright RG, Donovick PJ, Dolinsky Z, Hurd Y, Cypess R. Behavioral changes in mice infected with *Toxocara canis*. J Toxicol Environ Health. 1982 Oct-Nov;10(4-5):621-6.

24 – Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE, Huiza AF, Sevilla CR, Jiménez S. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by DOT-ELISA test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009 Mar-Apr;51(2):67-71.

25 – Fillaux J, Santillan G, Magnaval JF, Jensen O, Larrieu E,Sobrino-Becaria CD. Epidemiology of toxocariasis in a steppe environment: the Patagonia study. Am J Trop Med Hyg. 2007 Jun;76(6):1144-7.

26 – Campos-Júnior D, Elefant GR, Silva EOM, Gandolfi L, Jacob CMA, Tofeti A, et al. Frequência de soropositividade para antígenos de *Toxocara canis* em crianças de classes sociais diferentes. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 July; 36(4):509-513.

27 - Santos SV, Moura JV, Lescano SA, Castro JM, Ribeiro MC, Chieffi PP. Behavioural changes and muscle strength in *Rattus norvegicus* experimentally infected with *Toxocara cati* and *T. canis*. J Helminthol. 2015 Jul;89(4):465-70.

28 - Corrêa FM, Chieffi PP, Lescano SA, Santos SV. Behavioral and memory changes in *Mus musculus* coinfected by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014 Jul-Aug;56(4):353-6.

29 - Holland CV, Hamilton CM. The significance of cerebral toxocariasis: a model system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the imune response. J Exp Biol. 2013 Jan 1;216(Pt 1):78-83.

30 - Holland CV, Cox DM. *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered hostbehaviour? J Helminthol. 2001 Jun;75(2):125-35.

31 – Vyas A, Sapolsky R. Manipulation of host behaviour by *Toxoplasma gondii*: what is the minimum a proposed proximate mechanism should explain? Folia Parasitol(Praha). 2010 Jun;57(2):88-94.

32 – Haroon F, Händel U, Angenstein F, Goldschmidt J, Kreutzmann P, Lison H, et al. *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. PLoS One.2012;7(4):e35516.

33 – Gonzalez LE, Rojnik B, Urrea F, Urdaneta H, Petrosino P, Colasante C, Pino S, Hernandez L. *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats A behavioral analysis. Behav Brain Res. 2007 Feb 12;177(1):70-9.

34 - Chieffi PP, Del Guércio VMF, Ueda M, Mello LB. Importância de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil como hospedeiros

paratênicos de *Toxocara canis* (Ascaroidea, Nematoda). Rev Inst Adolfo Lutz, 1981; 41:89-91

35 – Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. Scand J Infect Dis. 2012 Nov;44(11):805-14.

36 – Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat Rev Immunol. 2003 Sep;3(9):733-44.

37 - Chieffi PP, Santos SV, Queiroz ML, Lescano SA. Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009 Oct-Dec;51(6):301-8.

38 - Overgaauw PAM. Aspect of *Toxocara* epidemiology: Human toxocarosis. Crit Rev Microbiol. 1997;23(3):215-31.

39 - Queiroz ML, Chieffi PP. Sindrome de *larva migrans* visceral e *Toxocara canis*. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 2005;50(3):117-20.

40 - Mattos-Junior DG. Manual de Helmintoses comuns em cães. Niteroi: Universidade Federal Fluminense; 1999.p.34-46.

41 - Urquhart GM, Armour J, Dunn AM, Jennings FW. Parasitologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990.p.72-7.

42 - SPRENT JF. The life history and development of *Toxocara cati* (Schrank 1788) in the domestic cat. Parasitology. 1956 May;46(1-2):54-78.

43 - Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. Korean J Parasitol. 2001 Mar;39(1):1-11.

44 - Eberhard ML, Alfano E. Adult *Toxocara cati* infections in U.S. children: report of four cases. Am J Trop Med Hyg. 1998 Sep;59(3):404-6.

45 - Wiseman RA, Lovel TW. Human infection with adult *Toxocara cati*. Br Med J. 1969 Aug;3(5668):454-5.

46 - Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. Trends Parasitol. 2009 Apr;25(4):182-8.

47 - Dziemian E, Zarnowska H, Kołodziej-Sobocińska M, Machnicka B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. Parasite Immunol. 2008 Mar;30(3):187-90.

48 – Caumes E. Treatment of cutaneous larva migrans and *Toxocara* infection. Fundam Clin Pharmacol. 2003 Apr;17(2):213-6.

49 – Schantz PM. *Toxocara* larva migrans now. Am J Trop Med Hyg. 1989 Sep;41(3 Suppl):21-34.

50 - Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol. 2004 Dec 9;126(1-2):57-72.

51 – Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. Trends Parasitol. 2013 Aug;29(8):380-4.

52 – Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis. 1992 Aug;15(2):211-22.

53 - Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites,bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998 Apr;11(2):267-99.

54 - Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009 Sep 27;364(1530):2749-61.

55 - Dawson D. Foodborne protozoan parasites. Int J Food Microbiol. 2005 Aug 25;103(2):207-27.

56 - Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis. 2003 Jan;9(1):55-62.

57 - Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999 Sep-Oct;5(5):607-25.

58 - Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, et al. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. J Infect Dis. 1997 May;175(5):1280-2.

59 - McLeod R, Boyer K, Roizen N, Stein L, Swisher C, Holfels E, et al. The child with congenital toxoplasmosis. Curr Clin Top Infect Dis. 2000;20:189-208.

60 – Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 2005 Jun;6(1):41-61.

61 - Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.

62 - Ferreira MU, Foronda AS, Schumaker TTS, editores. Fundamentos biológicos da parasitologia humana. Barueri,SP; Manole; 2003. p. 17-25.

63 – Ferreira MU, editor. Parasitologia contemporanea. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2012. p. XXX

64 – Beazley DM, Egerman RS. Toxoplasmosis. Semin Perinatol. 1998 Aug;22(4):332-8.

65 – Sukthana Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. Trends Parasitol. 2006 Mar;22(3):137-42. Epub 2006 Jan 30. Review. Erratum in: Trends Parasitol. 2006 Jun;22(6):246.

66 - Poulin R, Fredensborg BL, Hansen E, Leung TL. The true cost of host manipulation by parasites. Behav Processes. 2005 Mar 31;68(3):241-4.

67 - Kar N, Misra B. *Toxoplasma* seropositivity and depression: a case report. BMC Psychiatry. 2004 Feb 5;4:1.

68 - Lescano SZ, Queiroz ML, Chieffi PP. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 Oct;99(6):627-8.

69 – Mitra R, Sapolsky RM, Vyas A. *Toxoplasma gondii* infection induces dendritic retraction in basolateral amygdala accompanied by reduced corticosterone secretion. Dis Model Mech. 2013 Mar;6(2):516-20.

70 - Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat Protoc. 2007;2(2):322-8.

71 - Nasello AG, Machado C, Bastos JF, Felicio LF. Sudden darkness induces a high activity-low anxiety state in male and female rats. Physiol Behav. 1998 Feb 1;63(3):451-4.

72 – Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. J Comp Physiol Psychol. 1955 Aug;48(4):254-60.

73 – Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1984;327(1):1-5.

74 – Hall CS. Emotional behavior in the rat: I.Defecation and uritation as measures of individual differences in emotionality. J Comp Psychol. 1934, 18:385-403.

75 – Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur J Pharmacol. 2003 Feb 28;463(1-3):3-33.

76 – Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Behav Brain Res. 2002 Aug 21;134(1-2):49-57.

77 - Ramos A., Berton O, Pierre M, Chauloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains. Behav. Brain Res. 1997; 85:57-69.

78 – Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav. 1993 Feb;44(2):463-9.

79 – Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmacol Ther. 1990;46(3):321-40.

80 – Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and na extremely low frequency pulsed magnetic field. Neurosci Biobehav Rev. 2001 May;25(3):235-60.

81 - Barnes, CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. J Comp Physiol Psychol. 1979;93(1):74-104.

82 - Zinser EG, Hartmann T, Grimm MO. Amyloid beta-protein and lipid metabolism. Biochim Biophys Acta. 2007;1768(8):1991-2001.

83 - Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. Pharmacol Rev. 2002;54(3):469-525. Review. *Erratum* in:Pharmacol Rev. 2006;58(2):280

84 - Vinters HV. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. Stroke.1987;18:311-324.

85 - Halper J, Scheithauer BW, Okazaki H, Laws ER Jr: Meningo-angiomatosis: A report of six cases with special reference to the occurrence of neurofibrillary tangles. J Neuropathol Exp Neurol. 1986;45:426-446.

86 - Wisniewski KE, Jervis GA, Moretz RC, Wisniewski HM: Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. Ann Neurol. 1979; 5:288-294.

87 - Zolazd JA, Pilc A. The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. Journal of Physiologu and Pharmacology. 2010; 61(5):533-541.

88 – Duffau H. Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. J Clin Neurosci. 2006 Nov;13(9):885-97.

89 – Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. Front Neuroendocrinol. 2004;25(2):77-107.

90 – Noga O, Englmann C, Hanf G, Grützkau A, Seybold J, Kunkel G. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. Clin Exp Allergy. 2003;33(5):649-54.

91 - Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. Neurosci Lett. 2002; 328:261-264.

92 – Komulainen P, Pedersen M, Hänninen T, Bruunsgaard H, Lakka TA, Kivipelto M, et al. BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study. Neurobiol Learn Mem. 2008 Nov;90(4):596-603.

93 – Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2001 Jan;63(1):71-124.

94 – Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. Cereb Cortex. 1991;1: 103–116.

95 - YongHua Z, YuHong H, XiangMing G, YuZheng H, Jie W, Min D, et al. Effect of *Toxoplasma gondii* infection upon the expressions of brain-derived neurotrophic factor and N-methyl-D-aspirate receptor in rat hippocampus. Chin J Zoonoses. 2009; 25(12):1166-1169

96 – Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods.1985 Aug;14(3):149-67.

97 - Guaraldo L, Chagas DA, Konno AC, Kom GP, Pfiffer T, Nasello AG. Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. J Ethnopharm. 2000; 72:61-67.

98 - Silva MRP, Bernardi MM, Nasello AG, Felício LF. Influence of lactation on motor activity and elevated plus-maze behavior. Braz J Med Bio Res. 1997; 30:241-44.

99 - Babovic D, O'Tuathaigh CM, O'Connor AM, O'Sullivan GJ, Tighe O, Croke DT, et al. Phenotypic characterization of cognition and social behavior in mice with heterozygous versus homozygous deletion of catechol-O-methyltransferase. Neuroscience. 2008;155(4):1021-9.

100 - Görtz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambrée O, Keyvani K, Paulus W, et al. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. Behav Brain Res. 2008 Aug 5;191(1):43-8.

101 - Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacol Biochem Behav. 1986 Mar;24(3):525-9.

102 - Quirion R, Robitaille Y, Martial J, Chabot JG, Lemoine P, Pilapil C, et al. Human brain receptor autoradiography using whole hemisphere sections: a general method that minimizes tissue artifacts. Synapse. 1987;1: 446-454,.

103 - Sunyer B, Patil S, Högel H, Lubec G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in mice. Prot Exchange. 2007. doi:10.1038/nprot.2007.390.

104 – Poulin R, Randhawa HS. Evolution of parasitism along convergent lines: from ecology to genomics. Parasitology. 2015 Feb;142 Suppl 1:S6-S15.

105 - Holmes JC, Bethel WM. Modification of intermediate host behavior by parasites. In: Canning EU, Wright CA, editors. Behavioural aspects of parasite transmission. London: Academic Press; 1972.p.123-149.

106 - Reperant LA, Hegglin D, Tanner I, Fischer C, Deplazes P. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. Parasitology. 2009;136:329-37.

107 – Jones JL, Kruszon-Moran D, Won K, Wilson M, Schantz PM. *Toxoplasma gondii* and *Toxocara* spp. Co-infection. Am J Trop Med Hyg. 2008; 78(1):35-9.

108 – Azab ME, Safar EH, Khattab HM. Concomitant *Toxoplasma* and *Toxocara* infections. J Egypt Public Health Assoc. 1990;65(3-4):253-61.

109 – Telfer S, Birtles R, Bennett M, Lambin X, Paterson S, Begon M. Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data. Parasitology. 2008 Jun;135(7):767-81.

110 – Cox FE. Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology.2001;122 Suppl:S23-38.

111 – Read AF, Taylor LH. The ecology of genetically diverse infections. Science. 2001 May 11;292(5519):1099-102.

112 – Queiroz ML, Viel TA, Papa CH, Lescano SA, Chieffi PP. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* coinfected by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013 Jan-Feb;55(1):51-3.

113 – Johnston AL, File SE. Sex differences in animal tests of anxiety. Physiol Behav. 1991 Feb;49(2):245-50.

114 - River C. Gender, sex steroids, corticotropin-reseasing factor, nitric oxide and the HPA response to stress. Pharmacol Biochem Behav. 1999, 64:739-751.

115 - Guo AL, Petraglia F, Criscuolo M, Ficarra G, Nappi RE, Palumbo M, et al. Acute stress or lipopolysaccharide-induced corticosterone scretion in female rats in independent of the oestrous cycle. Eur J Endocrinol. 1994.; 131:535-539.

116 – Hiroi R, Neumaier JF. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. Behav Brain Res. 2006 Jan 6;166(1):93-100.

117 – Gouveia-Júnior A, Morato S. Influência do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. Interação Psicol. 2002,6(2):141-48.

118 – Mora S, Dussaubat N, Díaz-Véliz G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. Psychoneuroendocrinology. 1996 Oct;21(7):609-20.

119 – Albonetti ME, Farabollini F. Behavioural responses to single and repeated restraint in male and female rats. Behav Processes.1992 Dec;28(1-2):97-109.

120 - Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpfull considerations. Braz J Biol. 2002;62:609-614.

121 – Díaz-Véliz G, Alarcón T, Espinoza C, Dussaubat N, Mora S. Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. Pharmacol Biochem Behav. 1997 Nov;58(3):637-42

122 - Hrdá S, Votýpka J, Kodym P, Flegr J. Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral change in mice. J Parasitol. 2000;86(4):657-63.

123 – Lovick TA. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. Braz J Med Biol Res. 2012 Apr;45(4):314-20.

124 - House, P.K.; Vyas, A.; Sapolsky, R. Predator cat odors activate sexual arousal pathways in brains of *Toxoplasma gondii* infected rats. PLoS ONE. 2011. 6(8):e23277.

125 - Dielenberg RA, McGregor IA. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. Neurosci Biobehav Rev. 2001;25:597-609.

126 – Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci. 2008 Jan;9(1):46-56.

127 - Hamilton CM, Brandes S, Holland CV, Pinelli E. Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. Parasite Immunol. 2008;30:181-5.

128 – Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. Brain Res Bull. 1997;44(3):297-305.

129 – Adamec R., Blundell J., Burton P. Role of NMDA receptors in the lateralized potentiation of amygdala afferent and efferent neural transmission produced by predator stress. Physiol. Behav. 8 2005;6, 75-91.

130 – Mitra R., Jadhav S., McEwen B. S., Vyas A., Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005 Jun 28;102:9371-9376

131 – Rainnie DG, Bergeron R, Sajdyk TJ, Patil M, Gehlert DR, Shekhar A. Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. J Neurosci. 2004; 24, 3471-3479.

132 – Vyas A., Mitra R., Chattarji S. Enhanced anxiety and hypertrophy in basolateral amygdala neurons following chronic stress in rats. Ann N Y Acad Sci. 2003; 985:554-555

133 – Vyas A., Mitra R., Shankaranarayana Rao B. S., Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J Neurosci. 2002;22:6810-6818

134 – Adamec R. E., Burton P., Shallow T., Budgell J. Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle – effective hemisphere depends on the behavior. Physiol Behav. 1998;65:739-751

135 – Sajdyk TJ, Shekhar A. Excitatory amino acid receptors in the basolateral amygdala regulate anxiety responses in the social interaction test. Brain Res. 1997;1;764(1-2):262-4.

136 - Cheng-Jee H, Ying-Jay L, Shih-Jen T. Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. Brain Res Bull. 2011;86:287-297.

137 – Olson LJ, Rose JE. Effect of Toxocara canis infection on the ability of White rats to solve maze problems. Exp Parasitol. 1966 Aug;19(1):77-84.

138 - Dolinsky ZS, Burright RG, Donovick PJ, Glickman LT, Babish J, Summer B, et al. Behavioural effects of lead and *Toxocara canis* in mice. Science. 1981;213:1142-4.

139 - Good B, Holland CV, Stafford P. The influence of inoculums size and time post-infection on the number and position of *Toxocara canis* larvae recovered from the brains of outbred CD1 mice. J Helminthol. 2001;75:175-81.

140 – Burren CH. The distribution of Toxocara canis larvae in the central nervous system of rodents. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1972;66(6):937-42.

141 - Gale GD, Anagnostaras SG, Godsil BP, Mitchell S, Nozawa T, Sage JR, et al. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. J Neurosci. 2004 Apr 14;24(15):3810-5

142 - Berdoy M, Smith P, MacDonald DW. Stability of social status in wild rats: age and the role of settled dominance. Behaviour. 1995;132:193-212.

143 - Berdoy M, Webster JP, MacDonald DW. Parasite-altered behavior: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific?. Parasitology. 1995;111:403-409.

144 – Kalbe, M., K. M. Wegner, and T. B. H. Reusch. Dispersion patterns of parasites in 0+ year three-spined sticklebacks: a cross population comparison. J Fish Biol. 2002;60:1529–1542.

145 – Cézilly F, Perrot-Minnot MJ, Rigaud T. Cooperation and conflict in host manipulation: interactions among macro-parasites and micro-organisms. Front Microbiol. 2014 Jun 11;5:248.

146 – Hafer N, Milinski M. When parasites disagree: evidence for parasite-induced sabotage of host manipulation. Evolution. 2015 Mar;69(3):611-20.

147 - Fabiani S, Pinto B, Bruschi F. Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: can serological studies establish a clear relationship? Neurol Sci. 2013;34:417-425.

148 - Flegr J, Preiss M, Klose J, Havlícek J, Vitáková M, Kodym P. 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. 2003 Jul;63(3):253-68.

149 – Quattrocchi G, Nicoletti A, Marin B, Bruno E, Druet-Cabanac M, Preux PM. Toxocariasis and epilepsy: systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(8):e1775.

150 – Richartz E, Buchkremer G. Cerebral toxocariasis: a rare cause of cognitive disorders. A contribution to differential dementia diagnosis. Nervenarzt. 2002, May;73(5):458-62.

151 - Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR, Yolken RH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. Schizophr Bull. 2007;33:729–736.

152 - El-Sahn AA, Shatat HZ, Ghitany EM. Seropositivity of toxoplasmosis in patients with schizophrenia. J Egypt Public Health Assoc. 2005;80:509–524.

153 - Kozar Z. Studies of toxoplasmosis among the mentally sick. Bull Inst Marit Trop Med Gdansk. 1953;5:142–145.

154 - Bagyinszky E; Youn Y; An S; Kim S. Diagnostic methods and biomarkers for Alzheimer's disease. Toxicol Environm H Sci. 2014;6(3):133-147.

155 – Guzen FP, Cavalcanti JRLP. Influência das proteínas beta amiloides e TAU na doença de Alzheimer. Facene/Famene. 2012; 10(1):57-60.

156 - Mattson PM. Methylation and acetylation in nervous system development and neurodegenrative disorders. Aging Res Rev. 2003;2:329-42.

157 - Mattson MP, Mattson EP. Amyloid peptide enhances nail rusting: novel insight into mechanisms of aging and Alzheimer's disease. Ageing Res Rev. 2002;1(3):327-30.

158 - Fan CK, Holland CV, Loxton K, Barghouth U. Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders? Clin Microbiol Rev. 2015;Jul;28(3):663-86.

ANEXOS

Anexo A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174
e-mail:**cpq-imt@usp.br**

São Paulo, 31 de agosto de 2011.

Ilmo (a)

Dr. (a) PEDRO PAULO CHIEFFI

(aos cuidados de Sergio Vieira dos Santos)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2011/098** e intitulado "Infecção concomitante experimental de *Rattus norvegicus* por *Toxocara canis* e *Toxoplasma gondii:* estudo comportamental e histopatológico", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Vice-Presidente (em exercício)
Comissão de Pesquisa e Ética do IMTSP

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