

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Utilização da técnica de *c-fos* para o mapeamento de possíveis áreas do sistema nervoso central, envolvidas na elaboração da resposta imune, induzida por *Toxoplasma gondii*, em ratos.

KELY YOSHIKO MARTINS SHIGUEKAWA

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia - MG
Dezembro - 1995**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Utilização da técnica de *c-fos* para o mapeamento de possíveis áreas do sistema nervoso central, envolvidas na elaboração da resposta imune, induzida por *Toxoplasma gondii* em ratos.

KELY YOSHIKO MARTINS SHIGUEKAWA

CEZAR LAERTE NATAL

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia - MG
Dezembro - 1995**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Utilização da técnica de *c-fos* para o mapeamento de possíveis áreas do sistema nervoso central, envolvidas na elaboração da resposta imune, induzida por *Toxoplasma gondii*, em ratos.

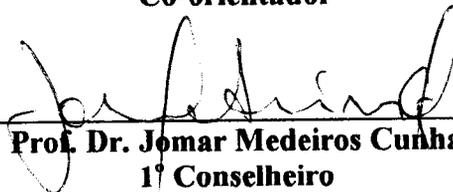
Aprovada pela comissão examinadora em 11/12/195 Conceito A
100,0



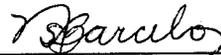
Prof. Dr. Cezar Laerte Natal
Orientador



Prof. Dr. José Roberto Mineo
Co-orientador



Prof. Dr. Jomar Medeiros Cunha
1º Conselheiro



Profª MS. Nora-Ney Santos Barcelos
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 11 de dezembro de 1995.

Dedico este trabalho,

à Deus, que nos ampara em seus braços todos os dias, possibilitando a realização de nossos sonhos;

à minha família, pelo amor, apoio e compeensão nos momentos mais difíceis;

ao Prof. Dr. Cezar Laerte Natal, pela amizade, paciência e orientação precisa, imprescindíveis para minha formação profissional e pessoal.

Agradecimentos,

Ao co-orientador Prof. Dr. José Roberto Mineo, pela confiança, incentivo e colaboração, essenciais para realização deste trabalho.

Ao Professor Silvio, pelo auxílio e contribuição na minha formação profissional.

À Dr^a Deise, pela amizade, auxílio e cooperação no desenvolvimento dos trabalhos laboratoriais.

A Ruberpaulo, pelo amor, carinho e presença constante, em todos os momentos.

À Luciana, pela sincera amizade, cumplicidade e companheirismo de tantos anos.

Às amigas Adriana, Marta, Marina e Juliana, pelo apoio, convívio e compreensão.

Aos colegas, alunos, funcionários dos laboratórios de imunologia e fisiologia, e a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho

. . . obrigada.

RESUMO:

O *Toxoplasma gondii* é um esporozoário, parasita intracelular obrigatório, que infecta várias espécies de vertebrados, incluindo o homem. Este parasita é o agente etiológico da toxoplasmose que apresenta três estágios: o agudo, o subagudo e o crônico. A fase crônica caracteriza-se por persistência dos cistos do *T. gondii*, no sistema nervoso central, olhos e miocárdio. Há um grande número de trabalhos destacando a possibilidade do sistema nervoso central não apenas ser alvo de doenças, incluindo as parasitárias, mas também de poder, ele próprio, estar participando indiretamente da instalação dessas doenças. Vários aspectos neuro-psicológicos podem induzir ou, pelo menos, facilitar a instalação de processos relacionados à imunodeficiência, neoplasias e outras disfunções do organismo humano. Porém, ainda fica em aberto a questão de que áreas ou subsistemas do sistema nervoso central estariam diretamente relacionadas a tais processos. Talvez, métodos mais eficientes para trabalhar com regiões específicas do sistema neural e dinâmicos para mapeá-lo funcionalmente, sejam os instrumentos fundamentais para que esta relação, possa ser melhor compreendida. Assim sendo, através da técnica de **c-fos**, que permite a marcação específica de corpos de neurônios, este trabalho tinha como objetivo estudar a eventual participação de áreas do sistema neural na modulação da resposta imune em ratos inoculados com cepas RH de *Toxoplasma gondii*. A cinética de produção de anticorpos foi estabelecida e, no início da fase aguda os animais eram sacrificados e os cérebros processados para **c-fos**. Um outro grupo de ratos recebeu, antes da inoculação do parasita, dose única de um bloqueador dopaminérgico. Os resultados mostraram que não houve expressão diferencial de **c-fos** em qualquer área do sistema nervoso central. Isso, apesar das evidências de participação do mesmo na elaboração dos mecanismos imunológicos, uma vez que os animais tratados com haloperidol mostraram baixa produção de anticorpos sem entretanto desenvolverem a doença.

SUMÁRIO

Resumo	iv
1.0. Introdução	1
2.0. Objetivo	9
3.0. Materiais e Métodos	10
3.1. Soluções	10
3.2. Obtenção do parasita, camundongos e ratos	12
3.3. Manutenção dos taquizoítas	12
3.4. Inoculação dos parasitas em ratos	12
3.5. Formação dos grupos de ratos	13
3.6. Verificação da cinética de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	13
3.6.1. Obtenção dos soros	13
3.6.2. Teste ELISA	13
3.6.2.1. Sensibilização das microplacas	14
3.6.2.2. Bloqueio das placas sensibilizadas	14
3.6.2.3. Amostras de soros	14
3.6.2.4. Conjugado imuno-enzimático	14
3.6.2.5. Substrato enzimático	14
3.6.2.6. Leitura da reação	15
3.7. Procedimento para c-fos	15
3.7.1. Obtenção do encéfalo	15
3.7.2. Seriação do encéfalo	15
3.7.3. Imuno-histoquímica para c-fos	16
3.7.4. Intensificação por ósmio	17
3.8. Verificação da cinética de anticorpos para <i>T. gondii</i> , em ratos tratados com decanoato de haloperidol	17
3.8.1. Seleção de ratos	17
3.8.2. Administração do decanoato de haloperidol	17
3.8.3. Verificação dos efeitos do decanoato de haloperidol	18
3.8.4. Verificação da cinética de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	18
3.9. Análise estatística	18
4.0. Resultados	19
5.0. Discussão e conclusão	29
6.0. Referências bibliográficas	32

1. INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma zoonose que afeta várias espécies animais, incluindo, mamíferos e aves. Ela tem como causa o *Toxoplasma gondii*, um protozoário parasita intracelular obrigatório, que ocorre frequentemente na população humana. Sua maior afinidade é para as células do sistema fagocítico mononuclear, para os leucócitos e para as células parenquimatosas. Com a finalidade de penetrar nas células do hospedeiro, os toxoplasmas desenvolvem um processo ativo de endocitose (REY, 1992).

O parasitismo ocorre geralmente, sob a forma de uma infecção assintomática. Porém, indivíduos adultos suscetíveis, podem expressar a doença em um quadro agudo febril, com linfadenopatia. As crianças suscetíveis irão apresentar, encefalomielite e coriorretinite subaguda. A forma congênita, por causar a morte fetal ou retardo físico ou mental no recém-nascido, é particularmente grave.

A alta prevalência sorológica positiva, que atinge mais de 60% da população em alguns países, a grave infecção que ataca fetos e crianças pequenas, e o oportunismo da mesma, que também se manifesta com gravidade em indivíduos que venham sofrer processos imunodeficientes, colocam a Toxoplasmose como um problema, em termos de saúde pública (REY, 1992).

O *Toxoplasma gondii* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida e, nas classificações mais modernas, família Sarcocistidae (REY, 1992).

Sua morfologia nos preparados a fresco, apresenta forma irregular ovóide, um dos pólos sendo mais grosso e o outro mais afilado. A curvatura dos dois lados possuem raios distintos, assim, enquanto uma das faces laterais é mais fortemente curva, a outra é plana ou côncava. O aparelho apical é o responsável pela classificação deste parasita no filo Apicomplexa (REY, 1992).

Dependendo do habitat e do estado evolutivo em que se encontra, o *T. gondii* pode apresentar morfologia múltipla. As principais formas que o parasita apresenta durante o ciclo evolutivo são:

1. **Taquizoítas** - encontrados na fase aguda de uma infecção e também denominados de forma proliferativa, pois são móveis e de rápida multiplicação.
2. **Bradizoítas** - encontrados na fase crônica e também denominados de cistozoítos, proliferando-se lentamente dentro dos cistos.
3. **Oocistos** - forma infectante mais comum, são esféricos contendo dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (KAWAZOE, 1991).

O ciclo biológico do toxoplasma é heteroxeno, ou seja, desenvolve-se em duas fases distintas, uma assexuada e outra sexuada. A fase assexuada ocorre em tecidos de vários hospedeiros; nesta fase, para se proliferar, o taquizoíta divide-se sucessivamente por endodiogenia ou endopoligenia até o rompimento da célula parasitada (KAWAZOE, 1991). O início do ciclo sexuado consiste na diferenciação dos parasitas em gametas. Macrogametas e microgametas copularão, formando um zigoto. Este evolui somente no epitélio intestinal de felídeos, dando origem a oocistos, que mais tarde alcançarão o meio externo, amadurecerão entre 2 e 5 dias e se tornarão infectantes (REY, 1992).

Um hospedeiro suscetível pode adquirir toxoplasmose quando:

1. Ingerir oocistos maduros contendo esporozoítos, presente em fezes de gatos jovens.
2. Entrar em contato direto com taquizoítas, presentes em líquidos orgânicos;
3. Ingerir cistos encontrados em carne crua ou mal cozida.
4. Receber formas taquizoítas por passagem transplacentária (KAWAZOE, 1991).

O ser humano só se infecta com o toxoplasma quando este se encontra em sua fase assexuada. Porém, sua prevalência sorológica deve-se a diversos fatores, como geográficos, climáticos, hábitos alimentares e de higiene.

fundamentalmente pela chamada tétrede sintomática, enunciada por Sabin (PESSOA, 1982). São seus sintomas, a hidrocefalia com microcefalia, calcificações cerebrais, coriorretinite e retardamento mental.

O segundo tipo de toxoplasmose é denominada de forma adquirida e se manifesta por vários aspectos clínicos; desde casos inaparentes, linfadenopáticos banais até pneumônicos graves ou encefalites letais (PESSOA, 1982).

Três estágios são bem característicos da doença. O primeiro consiste na fase aguda, envolve todas as vísceras, incluindo o sistema nervoso central (SNC), geralmente é assintomática; algumas vezes porém se manifesta com pneumonite, hepatite, meningoencefalite e erupção cutânea. Na segunda fase, o doente passa para o estágio subagudo, onde há persistência e proliferação do toxoplasma no SNC e nos olhos. Esta fase pode apresentar-se assintomática ou manifestar-se por coriorretinite, calcificações cerebrais, micro e hidrocefalia. A última fase, fase crônica, depende da persistência dos cistos do toxoplasma no SNC, olhos e miocárdio. Porém, geralmente é assintomática (PESSOA, 1982).

Contrastando com a infecção de indivíduos normais, a doença é extremamente grave em indivíduos com imunodepressão. Infecções crônicas e totalmente assintomáticas, assumem caráter agudo em pacientes que venham sofrer depressão imunológica de diversas etiologias, ou em consequência de terapia imunossupressora (REY, 1992).

Em manifestações clínicas resultantes da parasitose no sistema nervoso central, a encefalite toxoplásmica, que aparece usualmente em pacientes aidéticos, é a causa mais freqüente de lesões focais intracerebrais. Massas lesionais hipodensas, múltiplas e bilaterais são reveladas pela tomografia computadorizada. As lesões possuem tropia para os gânglios da base. Todavia os abscessos podem aparecer isolados ou localizados em qualquer região do sistema nervoso central (REY, 1992).

O SNC através da interconexão de neurônios, torna-se um instrumento de ligações precisas, capazes de perceber estímulos externos e internos e iniciar uma série de operações lógicas para atender às necessidades físicas e psicológicas de um indivíduo (KANDEL, 1991).

Na última década, através de investigações científicas na área da Neuro-biologia, dados esclarecedores foram obtidos sobre vários aspectos funcionais do sistema neural; tais como, a associação dos sistemas neural e endócrino para a integração e regulação de muitos processos fisiológicos, psicológicos e sociais de um indivíduo. Em consequência disso, vários ramos e especialidades têm se desenvolvido na área da Neuro-biologia, tais como a neuro-psiquiatria, a neuro-endocrinologia, a neuro-psicologia, a neuro-linguística e outros. Mais

recentemente, um novo ramo vem ganhando importante espaço na literatura especializada, inaugurando e caracterizando a moderna era da Neuro-imunologia, ciência encarregada de estudar os aspectos funcionais e as interações entre os sistemas nervoso e imune.

Apesar da interconecção de diversos mecanismos, a modulação do sistema imune, tradicionalmente é efetuada por interações eficientes entre o antígeno e uma rede de células imunologicamente competentes. Implicações diversas, no entanto, irão sustentar a modulação desse sistema por caminhos diferentes daquele mediado pelo antígeno (ROITT, 1993). Admitese que vários estímulos ambientais, como estímulos sensoriais, estresse e fatores psicossociais, possam ser processados pelo sistema nervoso central e transformados em sinais capazes de modular a função do sistema imunológico (FELTEN & FELTEN, 1994). Dessa forma, o sistema imune estaria sofrendo a influência de fatores ambientais, indiretamente, através da ação desses estímulos sobre a atividade neurológica. A consequência disso é que desordens neuropsicológicas podem desarranjar a função imunomodulatória do SNC, provocando em seguida, distúrbios importantes no sistema imune (NEVEU et al., 1992).

As primeiras evidências coerentes da influência do SNC na resposta imune, datam de 1940, quando o psicanalista René Spitz conseguiu mostrar que aspectos neuropsicológicos induziam uma síndrome de imunodeficiência em crianças. Ele comparou duas populações de crianças desde o nascimento até os dois anos de idade. A primeira, eram crianças cujas mães morreram por ocasião do parto e, então, elas foram criadas em orfanatos com todos cuidados puericulturais, incluindo assistência médica e padrões de higiene. A segunda população, eram crianças filhas de prisioneiras que eram mantidas em creches contíguas à prisão. Tinham contato com as mães algumas horas por dia e eram assistidas por diferentes atendentes. O primeiro grupo estava constituído de crianças mais saudáveis e com melhor escore psicológico por ocasião do quarto mês de vida, quando foi feita a primeira avaliação pelo psicanalista. Tal quadro estava completamente revertido aos 14 meses a favor das crianças da creche. Aos dois anos, as crianças da creche caminhavam seguramente, falavam frases inteiras e apresentavam boa saúde física; as do orfanato eram tristes, mal caminhavam, falavam por monossílabos e apresentavam grande suscetibilidade a diversas infecções (KANDEL, 1991).

No Brasil, um trabalho envolvendo trinta pacientes portadores de neoplasias malignas, internados no Hospital Universitário do Rio de Janeiro, baseado em entrevistas e observações clínicas, 100% dos pacientes tinham, na origem da doença, uma relação com um distúrbio afetivo que poderia ser considerado como um estímulo estressante (MOREIRA, 1994).

Tem sido demonstrado, também, que células NK - natural killer- são afetadas por fatores psicológicos. Tais células, geralmente derivadas de linfócitos granulares grandes, estão amplamente distribuídas pelo organismo e são naturalmente exterminadoras de células tumorais, células infectadas por vírus e células de aloenxerto. Vários estudos têm constantemente mostrado uma importante relação entre a depressão, o decréscimo em número e atividade de células NK e a sua conseqüente associação com diversas infecções, dentre elas, a AIDS (SAHS et al., 1994).

A análise de trabalhos científicos que, de maneira particular, a partir da década de 90 vêm enriquecendo a literatura especializada, tem fornecido algumas pistas acerca da ligação do sistema neural com o sistema imune. Em resumo, podem ser consideradas duas vias principais - via neural e via neurohumoral - através das quais, o SNC pode processar e transformar sinais capazes de modular a função imune.

1. Via Neural: é uma possível rota, que através de nervos autonômicos, liga o SNC ao sistema imune. Principalmente nervos noradrenérgicos tendem a terminar primariamente em regiões de tecido linfóide ou até mesmo em células desse tecido. Em ratos, a inervação noradrenérgica provem do gânglio celiaco mesentérico superior e entra no baço através da artéria esplênica e as terminações nervosas chegam a tocar os linfócitos T. A liberação de mediadores químicos pode vir a alterar a função dos linfócitos, predominantes nessas regiões (RABIN et al., 1989).

2. Via Neuro-humoral: é o caminho que possibilita aos hormônios liberados direta ou indiretamente pelo SNC, ligarem-se a diversos receptores de células linfóides e acessórias, induzindo alterações na atividade funcional das células imunes. O caminho indireto seria pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com a liberação de glicocorticóides e sua conseqüente ação sobre o sistema imunológico. O caminho mais direto tem sido mostrado pela ação das endorfinas e encefalinas produzidas pelo sistema nervoso central e que se ligam a linfócitos resultando tanto no aumento quanto na supressão da função imune, dependendo das concentrações, da população de células utilizadas e das espécies animais estudadas (RABIN et al., 1989; FELTEN & FELTEN, 1994).

A destruição da Substância Negra em camundongos por utilização de neurotoxinas, induziu leve diminuição ou aumento de mitose de linfócitos do baço, conforme o hemisfério manipulado experimentalmente. Esse resultado sugere a possibilidade de uma modulação assimétrica do sistema neural sobre o sistema imune. Sugere ainda que, a nível subcortical, áreas dopaminérgicas estejam, direta ou indiretamente, envolvidas na neuroimunomodulação

(NEVEU et al., 1991). Nessa mesma linha, tem sido mostrado que lesões de áreas límbicas dopaminérgicas de camundongos afetam a atividade de células NK esplênicas ou a proliferação linfocitária, dependendo do hemisfério em que foi injetada a neurotoxina (DELEPLANQUE et al., 1994).

O conceito de interação entre os sistemas neural e imune tem sofrido alguma variação mais recentemente. Assim, a idéia de que o sistema imune é modulado pelo sistema neural tem sido substituída por uma visão mais abrangente de interação bidirecional entre os dois sistemas. Alguns estímulos induzem o próprio sistema modulado - sistema imune - a interferir nas atividades do seu modulador, o SNC. Um exemplo que ilustra essa interferência, é dado por um mecanismo eficiente pelo qual o sistema imune pode responder às informações transmitidas pelo cérebro. Citocinas, como a interleucina 1 e seus receptores, podem ser expressos no SNC por células imunes estimuladas por estresse que residem ou invadem esses tecidos. Essas citocinas podem induzir fases de rápido crescimento celular em alguns tecidos, doenças inflamatórias crônicas, crescimento de tumor, infecções e ainda, danos teciduais (HOPKINS & ROTHWELL, 1995). Células linfóides podem expressar fatores humorais classicamente compreendidos como exclusividade da hipófise. Tais hormônios hipofisários de células imunes, como por exemplo, o ACTH, participam, inclusive, dos mecanismos de retroalimentação com a hipófise e o hipotálamo (RABIN et al., 1989).

Embora existam inúmeras evidências da relação entre os dois sistemas em questão não são encontradas referências que permitam um localizacionismo mais estreito entre regiões do sistema nervoso central e atividades imunológicas. Talvez, métodos mais eficientes para trabalhar com regiões específicas do sistema neural e, dinâmicos para mapeá-lo funcionalmente, sejam os instrumentos fundamentais, para que a relação entre o SNC e a resposta imune possa ser melhor compreendida (SAGAR et al., 1988).

Atualmente os métodos de mapeamento funcional de áreas do SNC são classificados em invasivos e não-invasivos.

A tomografia computadorizada e a ressonância magnética, são exemplos importantes de métodos de mapeamento, não-invasivo. Tais métodos são indispensáveis para o diagnóstico e tratamento de pacientes com lesões focais intracerebrais, como os pacientes portadores de encefalite toxoplásmica. Porém, apesar de indispensáveis, esses métodos não garantem especificidade, podendo deixar dúvidas quanto à etiologia da doença.

Entre os métodos invasivos pode-se destacar o da 2-desoxiglicose (2DG) que avalia a atividade metabólica e mapeia primariamente a atividade funcional do neurópilo de determinada

região. Porém, a grande deficiência deste método é que ele não consegue evidenciar, numa determinada região encefálica, diferenças entre atividades intrínsecas dos neurônios daquela região e atividades dos campos terminais das fibras aferentes à mesma.

Um outro método largamente utilizado nos últimos anos é o de **c-fos**, resultado da expressão de protoncogenes, que permite a identificação específica dos corpos de neurônios, através da marcação imuno-histoquímica, dos núcleos ativados (MORGAN et al., 1987; SAGAR et al., 1988).

O oncogene **fos** foi primeiramente identificado e isolado do DNA de um osteosarcoma viral espontâneo retirado de camundongo. O gene **c-fos** é seqüenciado em 380 aminoácidos correspondendo a um peso de 40 kDa. Em camundongos e humanos, sua homologia corresponde a 94%, diferindo em apenas 24 aminoácidos (MÜLLER, 1986; VERMA, 1986).

Apesar dos protoncogenes estarem sujeitos a eficientes mecanismos de regulação, apresentam uma expressão basal mínima na maioria dos tipos celulares, incluindo neurônios (MÜLLER, 1986). Uma grande variedade de estímulos, novos ao animal e exógenos à célula, naturais ou provocados, podem ativar rápida e transitoriamente o gene **c-fos**. Como conseqüência, há um aumento na expressão da proteína **fos**, que através de técnicas adequadas, pode ser identificada no corpo celular (VERMA et al., 1987). A rápida e transitória indução de **c-fos** a sinais externos, sugerem que o produto do gene está associado com a transdução de sinais intranucleares e regulação de outros genes (MÜLLER, 1986).

Uma das publicações pioneiras resultante da utilização da técnica de **c-fos** no sistema nervoso é o trabalho de SAGAR e colaboradores (1988). Ratos foram submetidos à estimulação elétrica na região cortical sensório-motora. Como conseqüência, houve expressiva marcação imunocitoquímica por **c-fos** de corpos de neurônios no tálamo sensório-motor, nos núcleos pontinos, no globo pálido e no cerebelo do animal, todas elas, regiões funcionalmente relacionadas à estrutura estimulada.

O método tem sido utilizado também para relacionar áreas do sistema neural a comportamentos espécie-específicos como a importante relação paternal para a sobrevivência da cria em roedores do gênero *Microtus* (KIRKPATRICK et al., 1994); ou ainda, a expressão de comportamentos relacionados ao ritmo circadiano em mamíferos (PROSSER et al., 1994).

A contaminação de um indivíduo por novos agentes infecciosos, em condições normais de saúde, induz respostas imunes. Se é verdade que o SNC participa da elaboração de tais respostas, e as idéias acima apresentadas reforçam positivamente tal hipótese, estas áreas do

sistema neural poderiam ser evidenciadas utilizando-se técnicas adequadas de mapeamento não invasivo.

2. OBJETIVO

O *Toxoplasma gondii* apresenta, entre suas regiões preferenciais de instalação, o SNC. Ao entrar em contato, pela primeira vez, com este agente etiológico da toxoplasmose, a eventual participação do sistema nervoso na resposta imune poderia ser detectada pela expressão de **fos** nas áreas neurais envolvidas. Assim sendo, este trabalho propõe investigar a eventual participação do sistema nervoso central na elaboração de respostas imunológicas à infecção provocada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, através do mapeamento de áreas neurais por imuno-histoquímica para **c-fos**.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SOLUÇÕES:

Solução anti-freezing:

150g de sacarose

300ml de etileno glicol

500ml de NaPBS 0,05M

Solução azida:

0,2 g de azida sódica (anti-fúngico da KODAK)

1000 ml de KPBS 0,02M

Solução DAB (diaminobenzidina):

1 ml de água destilada

30 mg de DAB

Solução final de "triton buffer" (0,03M):

100 ml de KPBS 0,02M

300 microlitros de triton x 100%

1000 microlitros de soro normal de coelho

Solução KPBS (0,12M) - "STOCK SOLUTION":

2,96 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4)

17,2 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)

54 g de cloreto de sódio (NaCl)

980 ml de água destilada

Solução KPBS (0,02M):

150 ml da solução estoque 0,012M

750 ml de água destilada

Solução "LOADED":

100 ml de KPBS 0,02M

300 microlitros de triton x 100%

1000 microlitros de soro normal de cabra

Solução PBS (0,01M, pH = 7,2):

Solução salina tamponada com fosfato

1% de gelatina

Solução PBS-T:

0,99% de PBS

0,1% de detergente tween 20

Solução perfusora:

4% de paraformaldeído

3,14 g de tetraborato de sódio (pH = 9,5)

* O ajuste de pH foi feito com hidróxido de sódio e ácido acético.

Solução de pós-fixação:

50 ml de solução perfusora

10% de sacarose (pH = 9,5)

Solução de borohidreto :

99% de borohidreto
50 ml de KPBS 0,02M

Substrato enzimático :

5 microlitros de água oxigenada (H₂O₂) 30%
12 ml de solução tampão citrato de fosfato (pH = 5,0)
5 mg de orto fenileno diamina (OPD)

3.2. OBTENÇÃO DO PARASITA, CAMUNDONGOS E RATOS :

Os taquizoítas utilizados, de cepa RH de *Toxoplasma gondii*, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Mário Camargo, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Os camundongos alogênicos Swiss (*Mus musculos*) foram procedentes do biotério da empresa Valeé Nordeste S/A (Uberlândia-MG).

Os ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) foram provenientes do biotério do laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Uberlândia.

3.3. MANUTENÇÃO DOS TAQUIZOÍTAS :

Os taquizoítas foram mantidos por passagens intraperitoniais seriadas em camundongos. A cada 2 ou 3 dias a cavidade peritoneal foi lavada várias vezes com cloreto de sódio 0,15M e o exsudato, repicado para outros três animais (MINEO, 1982).

3.4. INOCULAÇÃO DO PARASITA EM RATOS :

Uma parte do exsudato peritoneal foi colhido, e os parasitas obtidos, contados em câmaras de Neubauer ao microscópio óptico. Os parasitas foram então lavados em meio MEM (Minimum Essential Medium), centrifugados por 3 minutos em alta rotação e inoculados em ratos.

3.5. FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE RATOS :

Três grupos de ratos foram formados. O primeiro grupo, foi formado após o repique de dois camundongos. Cinco ratos foram inoculados com 1 ml de meio MEM, contendo $3,7.10^7$ taquizoítas/rato. Este grupo foi destinado para a verificação da cinética de anticorpos anti-*T. gondii* destes animais.

O segundo grupo foi formado por 3 ratos. Dois foram inoculados com 1ml de meio MEM, contendo $3,7.10^7$ taquizoítas/rato; e um rato inoculado somente com meio MEM. Este grupo foi destinado para o procedimento imunohistoquímico de **c-fos**.

O terceiro grupo foi formado por quatro ratos, que foram inoculados com 0,8ml de meio MEM, contendo $3,4.10^8$ taquizoítas/rato. Nos quatro ratos, três dias antes da inoculação do parasita, foi injetado um antagonista dopaminérgico, decanoato de haloperidol na dose de 100 mg/kg. Este grupo também foi destinado à verificação da cinética da produção de anticorpos anti-*T. gondii*, destes animais.

3.6. VERIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii* :

3.6.1. Obtenção dos soros :

O primeiro grupo de ratos foi submetido a uma sangria prévia - dia zero - antes da inoculação do parasita. Outras 8 sangrias foram efetuadas, no intervalo de 2 dias. As sangrias foram feitas por punção do plexo vascular do ângulo medial da órbita. Um capilar foi introduzido nessa região e o sangue coletado em um Eppendorf até o volume aproximado de 1 ml por sangria. Após cada coleta, foi efetuado um tamponamento com chumaço de algodão, para prevenir eventual hemorragia. O sangue foi centrifugado e estocado a -20°C . Após a obtenção de todos os soros foi empregado o teste imunoenzimático - ELISA - para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*.

3.6.2. Teste ELISA:

A técnica de ELISA indireta (MINEO, 1982) foi utilizada com modificações.

3.6.2.1. Sensibilização das microplacas:

Foram utilizadas microplacas de poliestireno (HEMOBAG - CAMPINAS, SP), com fundo em U que sensibilizadas com taquizoítas de *T. gondii* ($10^5/50\mu\text{l/well}$) em PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01M; pH 7,2, adicionada de gelatina 1%). As placas foram mantidas à 37°C por aproximadamente 12 horas, embaladas em sacos plásticos, e depois estocadas à -20°C, até o momento de uso.

3.6.2.2. Bloqueio das placas sensibilizadas:

As placas sensibilizadas foram submetidas a 3 lavagens rápidas com PBS, em seguida bloqueadas pela adição de 200 microlitros/well de PBS-T, acrescido de leite desnatado em pó a 5%, por 30 minutos à 37°C.

3.6.2.3. Amostras de soros:

As amostras de soros foram diluídas em PBS-T, acrescido de soro de camundongo normal a 10%, em uma diluição 1/32 e adicionadas em um volume de 50 microlitros/well; em duplicata. Paralelamente foram adicionados amostras de soros, reagentes e não-reagentes, pré-determinadas, como controle da reação. As placas form incubadas por 45 minutos à 37°C.

3.6.2.4. Conjugado imuno-enzimático:

As placas foram submetidas a três ciclos de lavagens de 5 minutos com PBS-T, sendo em seguida adicionado de 50 microlitros/well de IgG de coelho e anti-gama-globulina de rato, marcada com peroxidase (WILLSON & NAKANE, 1978), na diluição 1/2000 em PBS-T, adicionado de soro de camundongo normal a 10% e incubados por 45 minutos a 37°C.

3.6.2.5. Substrato enzimático:

Após novo ciclo de lavagens - como antes descrito - foi adicionado o substrato enzimático às placas, e estas ficaram em repouso durante 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 25 microlitros/well, de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,02M.

3.6.2.6. Leitura da reação:

A leitura foi realizada através da determinação dos valores de absorbância a 492 nanômetros, em leitor de microplacas (Titertek Multiscan Plus-Flow, U.S.A.). As amostras que apresentaram valores de absorbância maiores ou iguais a média dos valores dos controles negativos, mais 2 desvios padrões, foram considerados positivos.

3.7 PROCEDIMENTO PARA C-FOS :

3.7.1. Obtenção do encéfalo:

O encéfalo de cada rato, do segundo grupo formado, foi obtido no terceiro dia após a inoculação dos taquizoítas. Esse dia foi o escolhido porque era o dia em que se evidenciava a ascensão da curva de produção de imunoglobulinas anti-*T.gondii*.

Os ratos eram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico, intraperitonealmente, e colocados sobre uma cama de gelo, por aproximadamente 1 minuto. Um catéter era introduzido no ventrículo esquerdo do animal e, por ele, passado 100 ml de solução salina à temperatura ambiente. Em seguida, também pelo catéter, era passado 1000 ml de solução perfusora. Terminada a perfusão o encéfalo era retirado e guardado por aproximadamente 24 horas na solução de pós-fixação.

3.7.2. Seriação do encéfalo:

Os encéfalos de ratos foram retirados da solução de pós-fixação, novamente imersos em uma solução, KPBS 0,02 M adicionada de sacarose 20% e conservados a 4°C. Nessas condições eles foram transportados para o laboratório de Neuro-biologia, do Prof. Newton Canteiras, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em São Paulo.

Os cortes dos encéfalos foram obtidos através de micrótomo (Reichert-Jung Histoslid 2000) por congelamento, com espessura de 30 micrômetros. Cada encéfalo era fixado na placa do micrótomo, e a seriação era feita no plano coronal, no sentido rostrocaudal. Os cortes eram coletados quatro a cada cinco; sendo que os quatro primeiros eram preservados e o quinto desprezado. Os cortes obtidos foram colocados seguidamente em três placas com solução anti-freezing, para posterior processamento para **c-fos**, e em uma com azida sódica, para posterior processamento histológico cresil violeta. Após a seriação completa, a placa com os cortes em azida era acondicionada a 4°C e os cortes com anti-freezing acondicionados a -20°C.

3.7.3. Imuno-histoquímica para c-fos:

Os cortes imersos em anti-freezing foram transferidos para placas com tela, contendo KPBS 0,02M e agitados por 10 minutos. Após a agitação, os cortes foram suspensos pela tela, e a placa lavada com água destilada. Foi renovado o KPBS 0,02M e os cortes agitados por 10 minutos. Após a segunda agitação, as placas foram lavadas com água destilada e em cada uma, foi adicionado, 50ml de água destilada e 500 microlitros de água oxigenada (H₂O₂) 30%, levemente homogeneizados. Os cortes foram imersos nesta solução e agitados por 10 minutos. Após este procedimento os cortes foram agitados 2 vezes em solução KPBS 0,02M. Os cortes foram transferidos para novas placas, cada uma contendo uma solução previamente preparada de borohidreto 99%, e agitados por 7 minutos. Depois foram imersos em KPBS 0,02M e agitados 5 vezes por 5 minutos e 4 vezes por 10 minutos. Os cortes foram transferidos para placas contendo 30 ml da solução final de triton 0,3M acrescida de 30 microlitros de anticorpo puro de c-fos - proporção 1/1000 - levemente homogeneizados. As placas foram vedadas e incubadas por 44 horas à 4°C. Após o período de incubação os cortes foram transferidos para outras placas contendo KPBS 0,02M. Foi efetuada uma leve agitação no primeiro momento, e depois trocando sempre de placas, mais três de 10 minutos. Após a última agitação, foi acrescentado vagorosamente 150 microlitros do anticorpo secundário biotilado, acrescido de "loaded". Estas placas foram agitadas por 45 minutos. Os cortes foram transferidos para placas contendo kit ABC (complexo avidina-biotina) e agitados por mais 45 minutos. Em seguida, os cortes foram transferidos para placas contendo KPBS 0,02 M e agitados 2 vezes por 10 minutos cada. Após esses procedimentos, os cortes foram transferidos para placas contendo a solução de anticorpo secundário e agitados por 30 minutos. Logo após os cortes foram agitados em KPBS 0,02M duas vezes por 10 minutos cada. Os cortes foram transferidos novamente para placas contendo kit ABC e agitados por 30 minutos. Foram novamente imersos em KPBS 0,02M e agitados três vezes, por 10 minutos. Os cortes foram transferidos para placas contendo solução DAB e agitados por 10 minutos. Nos últimos 5 minutos de agitação, em um recipiente, foi pipetado 100 microlitros de água oxigenada 30% , acrescida de 9,9 ml de água destilada. No final da agitação, em cada placa foi acrescentado 1000 µl desta solução. Esta etapa tem por finalidade permitir que os cortes de encéfalos de ratos reajam com esta solução e exponham o gene fos ativado. A reação foi interrompida pela imersão sucessiva dos cortes em 3 placas contendo KPBS 0,02M. Em novo KPBS 0,02M os cortes foram agitados mais 5 vezes

por 5 minutos cada. Ao final destes procedimentos os cortes foram ordenados no sentido rostro-caudal em lâminas histológicas.

3.7.4. Intensificação pelo ósmio:

Para evidenciar a coloração de fos, foi utilizada a intensificação pelo ósmio. Os cortes já montados foram passados por uma série de imersões:

1. Água destilada, por 3 minutos.
2. Ósmio 0,05M , por 40 segundos.
3. Álcool 50%, por 4 minutos.
4. Álcool 70%, por 4 minutos.
5. Álcool 95% I, por 3 minutos.
6. Álcool 95% II, por 3 minutos.
7. Álcool 100% I, por 3 minutos.
8. Álcool 100% II, por 3 minutos.
9. Xilol I, por 3 minutos.
10. Xilol II, por 3 minutos.

Ao fim desta intensificação, as lâminas foram cobertas com lamínulas.

3.8. VERIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS PARA *T. gondii*, EM RATOS TRATADOS COM DECANOATO DE HALOPERIDOL

3.8.1. Seleção dos ratos:

Nesta etapa foram selecionados ratos machos com peso entre 185 e 205 gramas. A verificação do peso destes animais foi necessária, para a dosagem do decanoato de haloperidol, bloqueador dopaminérgico.

3.8.2. Administração do decanoato de haloperidol:

A dosagem do decanoato de haloperidol utilizada, foi de 100 mg/kg , diluído em 1ml de salina. A injeção foi aplicada por via intramuscular. Preconiza-se que essa dose seja suficiente para manter a ação farmacológica do decanoato por 28 dias. Na medicina humana a dose terapêutica é de 100mg para uma pessoa de 70kg.

3.8.3. Verificação dos efeitos do decanoato de haloperidol:

Um dos efeitos colaterais do decanoato de haloperidol, é a manifestação de catatonia. Essa manifestação foi testada diariamente através do “rota hold”, até que se tivesse certeza de que o haloperidol tivesse atingido uma concentração plasmática terapêutica. No terceiro dia os ratos apresentaram os sinais de catatonia esperados. Foram, então, sangrados e, em seguida, inoculados com *T. gondii*.

3.8.4 VERIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*:

O procedimento para a verificação da cinética de anticorpos anti-*T. gondii* foi o mesmo utilizado para o primeiro grupo de ratos.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student, bicaudal e aceitos como significativos os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS :

Os ratos do grupo 1 serviram para fornecer informações quanto à cinética de produção dos anticorpos. Assim, o resultado do teste ELISA de todas as sangrias está mostrado na figura 1. Cada ponto na curva representa a média de 5 animais. Nessa figura, observa-se um aumento do nível de anticorpos no terceiro dia pós-inoculação dos taquizoítas. Esse foi o dia determinado para sacrificar os animais do grupo para o processamento do fos.

A figura 2 mostra a comparação entre regiões do encéfalo de camundongo que expressaram fos após convulsão induzida por metrazol (B e D) e regiões equivalentes em animal controle (A e C). Na figura 2B pode-se observar intensa marcação de corpos de neurônios do giro denteado do hipocampo e na figura 2D, neurônios do córtex piriforme. Nas figuras A e C apenas marcações esporádicas são observadas (MORGAN et al., 1987).

Os cortes de encéfalos submetidos a imuno-histoquímica para fos, após inoculação de taquizoítas, não demonstraram marcação diferencial entre animais infectados e animais controle, em todo sentido rostro-caudal, desde as regiões mais rostrais do telencéfalo até as mais caudais da medula oblonga, como mostram as figuras 3 a 6. As regiões mostradas nessas figuras correspondem ao *nucleus accumbens septi* (fig. 3); hipotálamo periventricular, incluindo a região do núcleo supra-óptico (fig. 4); substância cinzenta periaquedutal (fig. 5) e giro denteado

do hipocampo (fig. 6). A figura 7 mostra a mesma região hipocampal mostrada na figura 6, porém corada por cresil violeta.

A cinética de produção de anticorpos dos ratos do grupo 3, tratados com haloperidol, apresentou resultados semelhantes aos do grupo 1, controle. Entretanto, há um nível menor de produção de anticorpos nos animais tratados com haloperidol que se torna evidente no sexto dia pós-nfecção ($p = 0,015$), continua diferente quando se compara o oitavo dia do grupo sem haloperidol com o décimo dia do grupo tratado com haloperidol ($p = 0,012$). Entre os dias 10 e 13 não há significância e os valores voltam a ficar significantes, com menor produção de anticorpos pelo grupo tratado com haloperidol, a partir do décimo quarto dia ($p = 0,019$) quando comparado com o décimo quinto dia do grupo não tratado (fig. 8).

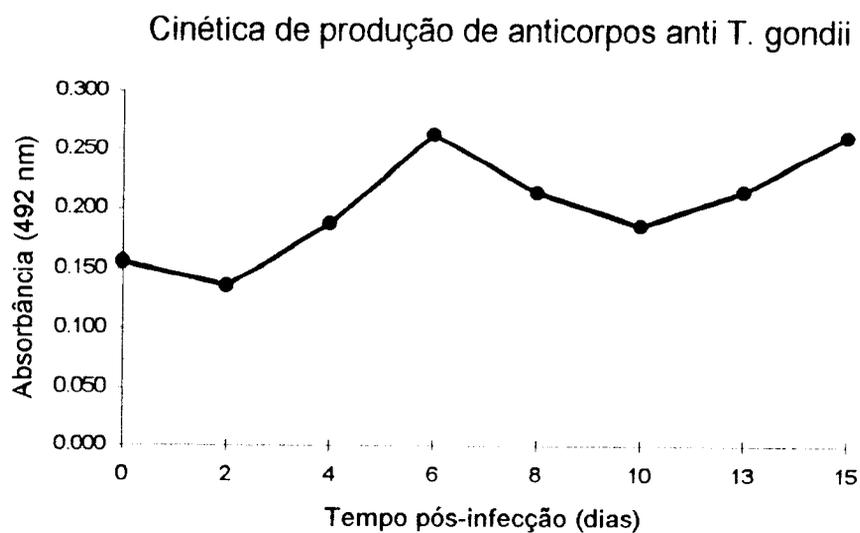


Figura 1 - Cinética da produção média de anticorpos anti *T.gondii* em ratos. O dia 0 corresponde ao dia em que os animais foram sangrados pela primeira vez e, em seguida, inoculados com taquizoítas de *T. gondii*. O “cut off” foi de 0.137. N = 5.

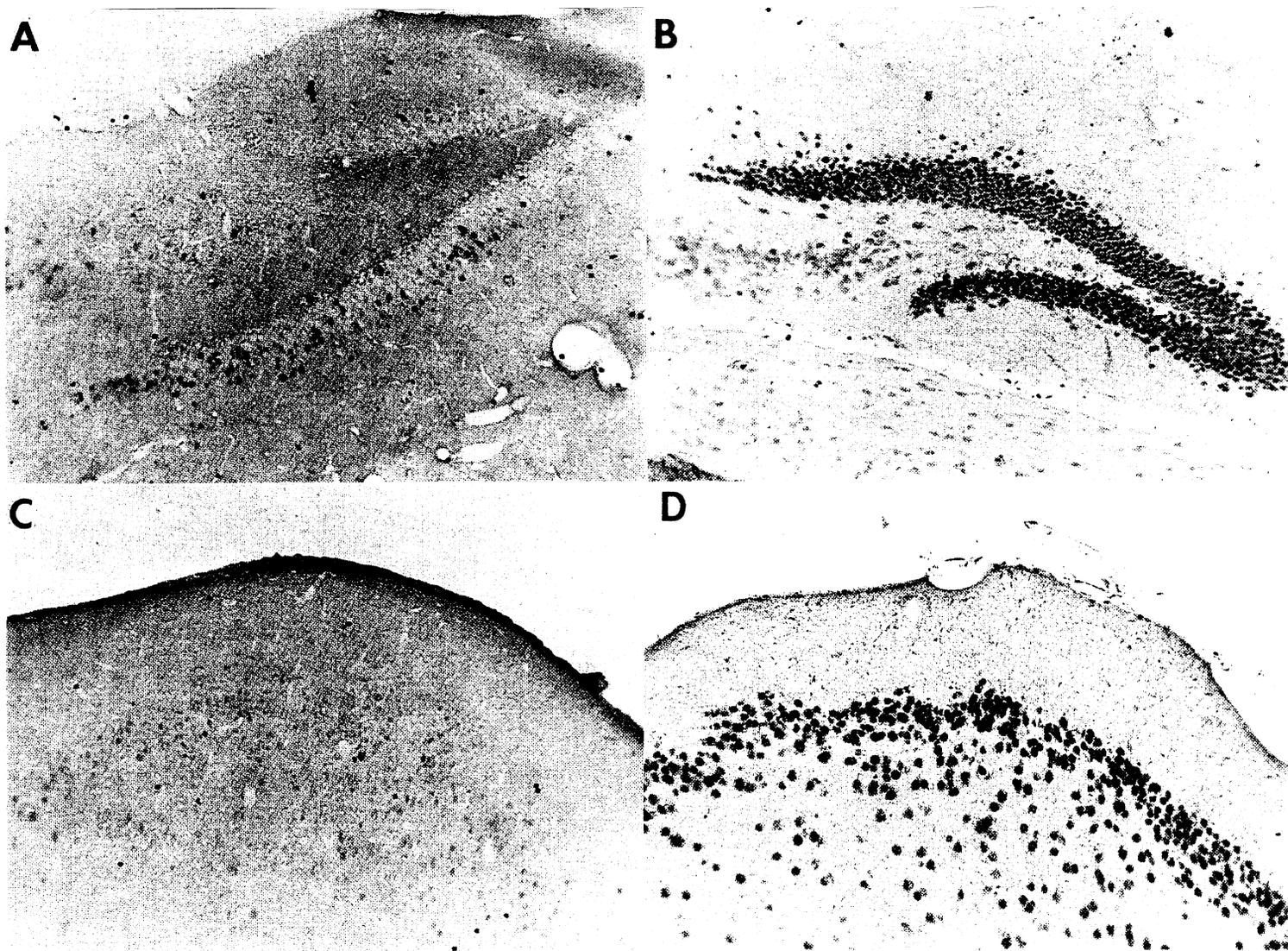


Figura 2 - Localização de *c-fos* em cérebro de camundongo. Comparação entre animais controle (A e C) e animais tratados com Metrazol (B e D). Observa-se marcação de células hipocâmpais (B) e do córtex piriforme (D) nos animais que tiveram epilepsia induzida pelo Metrazol (50 mg/kg). Aumento de 125 X. (MORGAN et al., 1987).



Figura 03 - Região do diencéfalo mostrando o *núcleo accumbens septi* que circunda a comissura anterior (indicada pela seta). Processamento imuno-histo-químico para evidenciar expressão de **c-fos**. Não se observa marcação diferencial da região. Ampliação 40 X.



Figura 04 - Região do hipotálamo periventricular mostrando o terceiro ventrículo. Em destaque, o núcleo periventricular e, na região inferior da foto, as porções iniciais do trato óptico. Processamento imuno-histoquímico para evidenciar expressão de **c-fos**.

Ampliação 40 X.



Figura 05 - Região do mesencéfalo mostrando o aqueduto cerebral e a substância periaquedutal. Processamento imuno-histoquímico para evidenciar expressão de **c-fos**. Ampliação 40 X.



Figura 06 - Região do diencefalo mostrando a formação hipocampal. Em destaque, o giro denteado. Processamento imuno-histoquímico para evidenciar expressão de **c-fos**.

Ampliação 40 X.

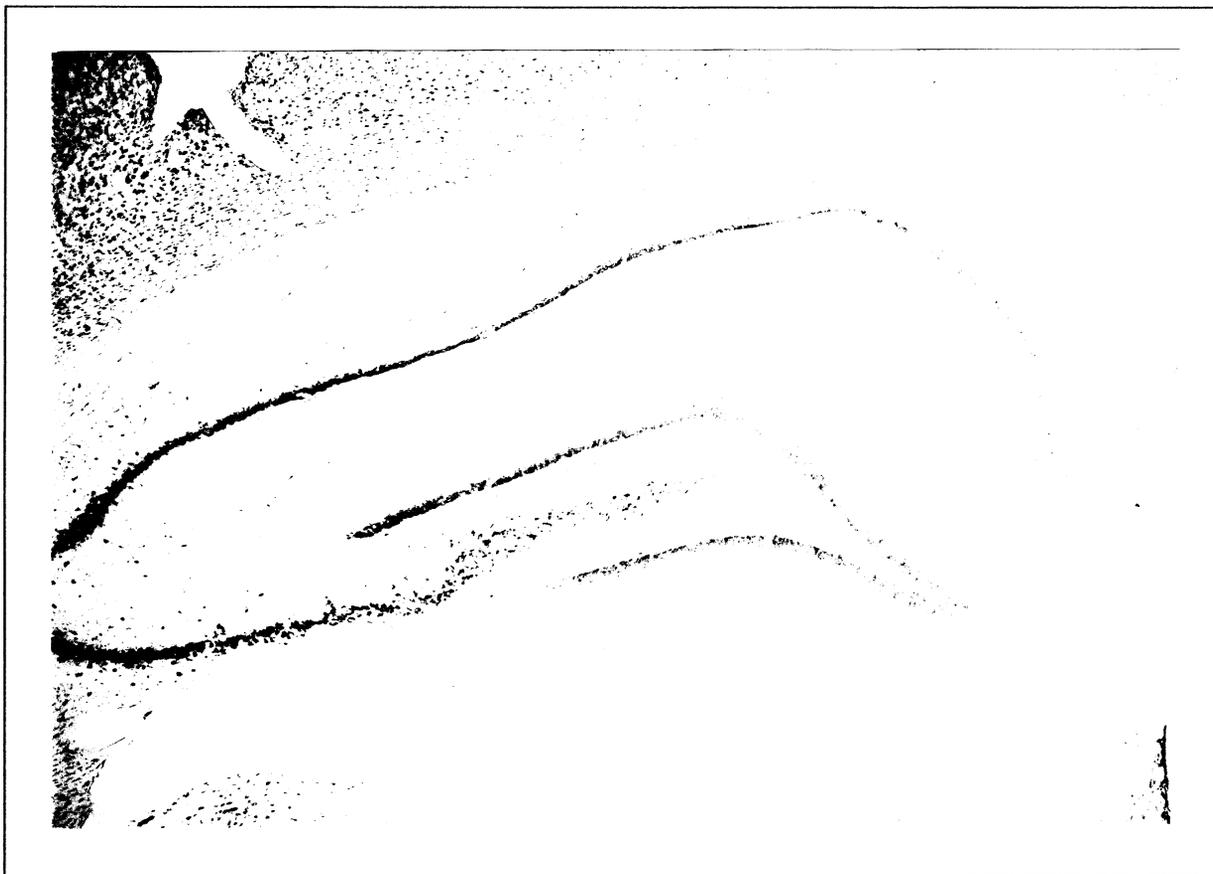


Figura 07 - Região do diencéfalo mostrando a formação hipocampal. Em destaque o giro denteado. Coloração cresil-violeta. Ampliação 40 X

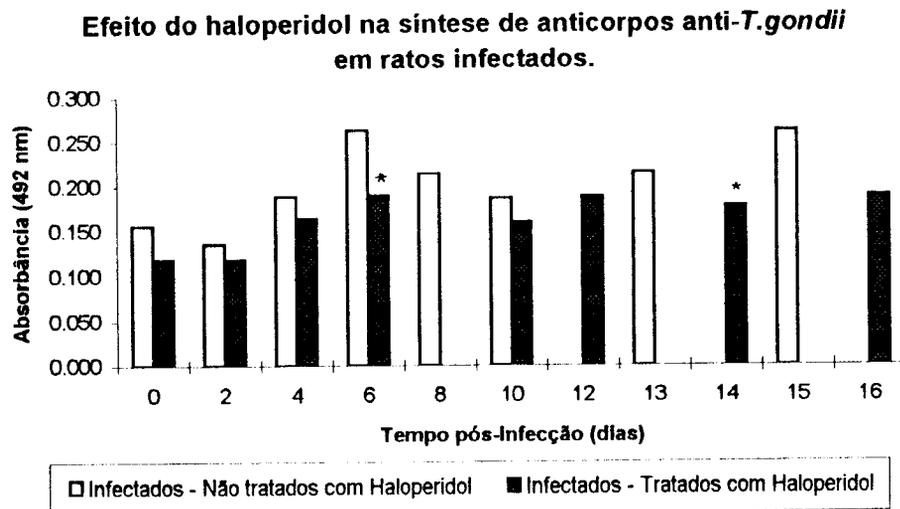


Figura 08 - Gráfico comparando o nível plasmático de anticorpos anti *T.gondii* de dois grupos de animais: um tratado com decanoato de haloperidol e outro não- tratado. O “cut off” foi de 0.137. As diferenças são significativas quando se compara os dois grupos no sexto dia ($p = 0.015$) e quando se compara o décimo quarto dia do grupo tratado com o décimo quinto do grupo não-tratado ($p = 0.019$).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos a partir da observação visual e verificação da cinética de anticorpos anti-*T. gondii* do grupo 1, permitiu-nos constatar que 100% dos ratos inoculados com *Toxoplasma*, adquiriram infecção assintomática. Em uma única infecção, diferentes respostas imunes com anticorpos específicos podem atuar contra os diferentes estágios do parasita (ROITT, 1993). Assim, segundo a cinética de anticorpos, foi possível constatar em tempos distintos, duas respostas ao parasita. A primeira iniciou por volta do terceiro dia, alcançando o máximo da infecção aguda no sexto dia, com uma suposta produção de IgM. Este anticorpo, caracteriza-se por ser sintetizado pelos plasmócitos frente a uma exposição inicial ao antígeno (RATNOFF, 1990). A segunda expressão significativa de níveis de anticorpos, teve início a partir do décimo dia, com possível expressão de IgG. Estes dados permitem inferir que a infecção evoluiu para uma resposta secundária, significando uma cronificação do processo infeccioso. Em camundongos, a cinética da produção de anticorpos, assim como a evolução da parasitose têm um aspecto bem distinto do observado em ratos, mostrando que a instalação da parasitose tem aspectos bem distintos apesar de serem os hospedeiros representantes da mesma ordem, **Rodentia**, de mamíferos. Nos camundongos, o primeiro pico de produção dos anticorpos anti-*T. gondii*, com predominância de IgM, ocorre por volta do terceiro ou quarto

dias. Os camundongos, contrastando com os ratos, não sobrevivem à fase aguda, morrem no intervalo de 7 a 8 dias, dependendo da virulência da cepa. Em humanos, a toxoplasmose, apresenta uma evolução muito semelhante àquela observada em ratos, respeitadas as diferenças temporais. Os níveis de IgM aumentam na primeira semana de infecção, e apresentam seu pico, geralmente dentro de 1 mês. A expressão máxima de IgG ocorre geralmente ao fim de 1 ou 2 meses (REY, 1992). Diferentemente dos camundongos, a toxoplasmose nos ratos e nos seres humanos é, geralmente, assintomática.

Em nossos resultados, em ratos, é digno de destaque o fato de que os níveis de anticorpos iniciam-se muito semelhantes em termos de cinética; tornam-se diferentes no sexto dia; novamente não são significantes no oitavo dia e voltam a apresentar significância estatística a partir do décimo dia. Isso ocorre porque a produção de anticorpos nos animais controle é bem maior do que nos animais tratados com haloperidol, que apresentam uma curva mais achatada de síntese de imunoglobulinas. Quando termina a fase aguda, o nível dos animais controle cai muito próximo ao dos animais tratados. Ao iniciar a fase crônica, com produção de IgG, os valores voltam a ficar diferentes porque aumenta a síntese dessas imunoglobulinas nos animais não tratados.

Embora a técnica de **c-fos** venha sendo largamente utilizada na neurobiologia, com grande sucesso nas tentativas de mapeamento funcional de áreas cerebrais, ela gerou resultados negativos para a nossa abordagem. Algumas hipóteses podem ser aventadas para se tentar explicar a falta de marcação: desde insuficiência do método até a não participação do sistema neural na modulação imunológica. A técnica de **c-fos** tem se mostrado ineficiente para mapear áreas cerebrais ativas em animais sujeitos a um jejum prolongado (Canteiras, comunicação pessoal). Pode ser que mecanismos alternativos relacionados ao metabolismo gliconeogênico que se instalam muito lentamente na tentativa de suprir as necessidades energéticas do animal não sejam eficientes para marcar áreas cerebrais, embora se saiba que elas participam na modulação de tal metabolismo. Da mesma forma, pode ser que a instalação gradual da infecção toxoplásmica não tenha suficiente sinalização para ativar os proto-oncogenes; daí a sua não expressão e conseqüente não marcação pela técnica em questão. Uma outra possibilidade é que a infecção seja suficiente para ativar tais genes; porém há de se considerar que eles representam, hoje, uma família e, ainda que sejam ativados pelo processo infeccioso, não obrigatoriamente seriam os genes do grupo **c**, o que justificaria os resultados negativos na nossa abordagem. Há de se considerar ainda, neste modelo experimental a hipótese de que o sistema neural não participe de mecanismos imunológicos. Entretanto, há evidências que permitem contrariar essa

o sistema límbico dopaminérgico forma uma alça envolvendo o núcleo acúmbeo, o complexo amigdalóide e a substância periaquedutal (MA & HAN, 1992). A lesão de áreas dopaminérgicas subcorticais, incluindo o núcleo acúmbeo, afeta a reatividade de células NK e a atividade proliferativa de linfócitos (DELEPLANQUE et al., 1994). Os neurônios dopaminérgicos do tronco encefálico, estão organizados em quatro vias principais: nigro-estriatal, túbero-infundibular, mesocortical, e mesolímbica. Na área tegmentar ventral originam-se as vias mesolímbica e mesocortical. A mesolímbica se projeta para o corpo estriado ventral e o núcleo acúmbeo; a mesocortical, para o cortex pré-frontal (KANDEL, 1991). Tais vias, são bloqueadas por neurolépticos, como o decanoato de haloperidol, que se ligam aos receptores dopaminérgicos D_2 , presentes nestas regiões. Os nossos resultados mostram que o bloqueio dopaminérgico sistêmico, por administração de haloperidol, resultou em redução na produção de anticorpos tanto na fase aguda quanto no início da cronificação. Com certeza esse bloqueio incluiu o sistema dopaminérgico mesolímbico. Portanto, esses resultados com haloperidol fornecem uma importante evidência de que o sistema neural está participando da resposta imunológica; reforçando, por conseguinte, as hipóteses de inadequação do método para tal abordagem.

Apesar de os animais tratados com haloperidol apresentarem um nível menor de anticorpos, eles não mostraram nenhuma manifestação sindrômica da doença que pudesse diferenciá-los do grupo não tratado.

A partir dos dados obtidos nesta pesquisa é possível concluir que a técnica de **c-fos** não é uma técnica adequada para o mapeamento funcional de eventuais áreas do SNC, estimuladas por uma infecção toxoplásmica, em ratos. Além disso, sugere que pode haver uma dissociação entre os processos humoral e celular da resposta imune. O bloqueio dopaminérgico poderia estar afetando o sistema humoral, porém deixando ileso o sistema celular que garantiria a eficiência do mecanismo imunológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

DELEPLANQUE, B.; VITIELLO, M.; LE MOAL, M.; NEVEU, P.J. (1994) Modulation of Immune Reactivity by Unilateral Striatal and Mesolimbic Dopaminérgic Lesions. **Neuroscience Letters**, 166: 216-220.

FELTEN, S.Y.; FELTEN, D.L.; (1994) Neural-immune Interactions. **Progress in Brain Research**, 100: 157-162.

HOPKINS, S.J.; ROTHWELL, N.J.; (1995) Cytokines and Nervous System I: expression and recognition. **Trends Neuroscience**, 18: 83-88.

KANDEL, E.R.; JESSEL, T.M.; Early experience and the fine tuning of synaptic connections. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Principles of Neural Science**. 3.ed. New York: Elsevier, 1991. p.945-958.

KAWAZOE, AU. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 8.ed. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1991. p.164-176.

- KIRKPATRICK,B.; KIM,J.W.; INSELT,T.R. (1994) Limbic system fos expression associated with paternal behavior. **Brain Res.**, **658**: 112-118.
- MA,Q.B.; HAN,J.S. (1992) Naloxone blocks opioid peptide release in periaqueductal gray and amigdala elicited by morphine injected into nucleo accumbens. **Peptides**, **13** (2): 261-5.
- MINEO,J.R.; **Detecção de antígenos e de anticorpos, com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose aguda.** São Paulo: Intituto de Ciências Biomédicas da USP, Departamento de Microbiologia e Imunologia, 1982. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia).
- MOREIRA,M.S. (1994) Depressão e cancer **An.Acad. Nec. Med.**,**154**: 114-117.
- MORGAN,J.I.; COHEN,D.R.; HEMPSTEAD,J.L.; CURRAN,T. (1987) Map pig Patterns of c-fos Expression in Central Nervous system After Seizure. **Science**, **237**: 192-197.
- MÜLLER,R. (1986) Cellular and viral fos genes: structure, regulatios of expression and biological properties of their enconded products. **Biochimica et Biophysyca Acta**, **823**: 207-225.
- NEVEU,P.J.; DELEPLANQUE,B.; VITIELLO,S.; ROUGE-PONT,F.; LE MOAL,M. (1992) Hemispheric Asymmetry in the Effects of Substantia Nigra Lesining on Lymphocyte Reactivity in Mice. **Intern. J. Neuroscience**, **64**: 267-273.
- PESSOA,S.B. Sporozoea - Família Sarcocystidae, Gêneros *Toxoplasma* e *Sarcosystis*. In: Pessoa,S.B.; MARTINS,A.V. **Parasitologia Médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982. p.252-274.
- PROSSER,R.A.; MACDONALD,E.S.; HELLER,H.C. (1994) C-fos mRNA in the suprachiasmatic nuclei in vitro shows a circadian rhythm and responds to a serotoninérgic agonist. **Mol. Brain Res.**, **25**: 151-156.

- RABIN,B.S.; SHELDON,C.; GANGULI,R.; LYSLE,D.T.; CUNNICK,J.E. (1989) Bidirectional Interaction Between the Central Nervous System and the Immune System. **Issue, 9**: 279-311.
- RATNOFF,O.D. Sangue. In: LEVY,M.N.; BERNE,R.M. **Fisiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1990. p. 285-294.
- REY,L. Toxoplasmose. In: REY,L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1992. p. 96-105.
- ROITT,I.; BROSTOFF,J.; MALE,D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1994. p. 9.1-9.14.
- SAGAR,S.M.; SHARP,T.; CURRAN,T. (1988) Expression of c-fos Protein in Brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science, 240**: 1328-1331.
- SAHS,J.A.; GOETZ,R.; MOHAN,R.; RABKIN,J.G.; WILLIAMS,J.B.W.; KERTZNER,R.; GORMAN,J.M. (1994) Psychological Distress and Natural Killer Cells in Gay men with and without HIV Infection. **Am. J. Psychiatry, 151**: 1479-1484.
- VERMA,I.M. (1986) Proto-oncogene fos: a multifaceted gene. **T.I.G., april**: 93-96.
- VERMA,I.M.; SASSONE-CORSI,P. (1987) Proto-oncogene fos: complex but versatile regulation. **Cell, 51**: 513-514.
- WILSON, M.B.; NAKANE,P.K. In: KAMPP,W.; HOLUBAR,K.; WICK,G. **Immunofluorescence and related staining techniques**. 6.ed. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press, 1978; p. 215-224.