

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**COMPONENTES DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E  
COLINÉRGICO NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS  
E NEUROLÓGICOS EM ROEDORES INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM *Toxoplasma gondii***

**TESE DE DOUTORADO**

**Alexandre Alberto Tonin**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2014**



**COMPONENTES DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E  
COLINÉRGICO NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E  
NEUROLÓGICOS EM ROEDORES INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM *Toxoplasma gondii***

**Alexandre Alberto Tonin**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa  
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em  
Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tonin, Alexandre Alberto

Componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico nos processos inflamatórios e neurológicos em roedores infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*. / Alexandre Alberto Tonin.-2014.

177 p.; 30cm

Orientadora: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2014

1. *Toxoplasma gondii* 2. Modulação inflamatória 3. E-NTPDase 4. E-ADA 5. AChE. BChE I. Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos II. Título.

---

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Alexandre Alberto Tonin. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: tonin.aat@gmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**COMPONENTES DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO  
NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E NEUROLÓGICOS EM  
ROEDORES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM  
*Toxoplasma gondii***

elaborada por  
**Alexandre Alberto Tonin**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

**Silvia Gonzalez Monteiro, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

**Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

**Aleksandro Schafer da Silva, Dr.** (UDESC)

**Virginia Cielo Rech, Dr<sup>a</sup>.** (UNIFRA)

Santa Maria, 06 de Junho de 2014.



*Dedico meu doutorado às pessoas mais importantes da minha vida:*  
*meu grande amor, Camila;*  
*meus pais, Enio e Claer, e a minha irmã, Paula;*  
*a minha família, em especial a meus avós:*  
*Alberto Tonin (in memoriam) e Oria Odeth Tonin (in memoriam),*  
*Orozimbo Marcondes Barbosa (in memoriam) e Maria Zancanaro Barbosa.*  
*Vocês sempre serão a razão para que eu continue em frente !!!*





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, criador de todas as coisas, pela vida e oportunidade de poder, a cada dia, aprender um pouco mais.

Agradeço a minha família. Meu muito obrigado a minha noiva Camila, meu grande amor. A cada novo dia que passo a teu lado, tu me proporcionas a oportunidade de poder ser um pouquinho mais humano, mais feliz e mais determinado. Não existem palavras pra dar significado a tudo isso. Agradeço aos meus pais, Enio e Claer, pelo amor, bons exemplos, pela ótima formação educacional, todos os incentivos e conselhos incondicionais que sempre me levaram a seguir o caminho da simplicidade e do bem. Agradeço à minha irmã, Paula, pelo amor, amizade, carinho e ternura. Vocês são os meus exemplos de vida.

Agradeço de maneira mais do que especial à minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, por toda a confiança, liberdade, paciência e ensinamentos durante essa trajetória. Muito obrigado, Prof<sup>ª</sup> Sonia, a Senhora abriu as portas para que eu pudesse trilhar o meu caminho, sem mais a sua ajuda nada disso teria acontecido. Agradeço também aos meus Co-Orientadores, Prof. PhD Mario Luiz de La Rue e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Fernanda Silveira Flores Vogel por toda a ajuda e ensinamentos, bem como por disponibilizarem a estrutura dos seus laboratórios para a realização deste trabalho. Obrigado à equipe do LADOPAR, em especial, a Giovana Camillo.

Agradeço a todos os meus amigos, vocês fazem parte deste momento. Um agradecimento mais do que especial ao pessoal do LABLEPTO, por todo o apoio nestes anos. Vocês foram fundamentais para a conclusão de mais esta etapa. Muito obrigado ao Prof. Maneco, aos meus grandes amigos Neusa, Jorge e Paulo, e a todos os estagiários. Agradeço em especial ao Leo, Jorge, Bruno e a Rhayanne, vocês dividiram muito mais do que o espaço no laboratório comigo, construímos uma grande amizade. Não Poderia deixar de agradecer à minha grande amiga Médica Veterinária, MSc, Luciana Faccio, pela ajuda no início do doutorado, colaborando para que hoje esta etapa esteja sendo concluída. Muito obrigado, Lu.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (UFSM), em especial a Maria, por toda a ajuda; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte institucional e financeiro, fatores que possibilitaram a realização plena deste doutorado.

Reservo este último parágrafo para agradecer, mais uma vez, de maneira mais do que especial ao meu grande amigo Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva. Aleks, muito obrigado por todo o conhecimento compartilhado, pela amizade, simplicidade, paciência e, fundamentalmente, por toda a ajuda durante o meu doutorado.



*“A vida começa todos os dias.”*

*ÉRICO VERÍSSIMO*



## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### COMPONENTES DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E NEUROLÓGICOS EM ROEDORES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Toxoplasma gondii*

AUTOR: ALEXANDRE ALBERTO TONIN  
ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. SONIA TERESINHA DOS ANJOS LOPES  
Santa Maria, 06 de Junho de 2014.

A toxoplasmose é doença zoonótica causada pelo *Toxoplasma gondii*, podendo levar à alterações funcionais, bioquímicas e estruturais, especialmente no sistema nervoso central. Estas, geralmente, são acompanhadas por uma marcante resposta imunoinflamatória em hospedeiros imunocompetentes. Infecções primárias com *T. gondii* estimulam a produção de altos níveis de citocinas, tais como IL-12 e IFN- $\gamma$ , pelas células do sistema imune inato, consistindo em um ponto principal no controle do parasito e resistência a doença. Em se tratando de resposta imune, os sistemas purinérgico e colinérgicos possuem algumas propriedades bem definidas, porém sem muitas informações sobre a inter-relação destes com a toxoplasmose. Desta maneira, os objetivos deste estudo foram avaliar as atividades (1) da E-NTPDase e E-ADA em linfócitos; (2) da AChE no sangue total e linfócitos, e BChE no soro; utilizando a cepa RH (virulenta) do *T. gondii*; e (3) avaliar os níveis de purinas e atividade da E-ADA no cérebro, utilizando-se as cepas RH e Me-49 (cistogênica). Os resultados da primeira avaliação demonstraram que a hidrólise do ATP e ADP foram aumentadas, bem como a atividade da E-ADA também esteve aumentada. No segundo experimento, observou-se um aumento na atividade da AChE nos linfócitos e no sangue total. Por fim, no terceiro experimento, verificou-se na infecção com a cepa RH um aumento nos níveis de ATP, ADP, AMP, adenosina, hipoxantina e xantina, e redução nos níveis de inosina. Nos animais infectados com a cepa Me-49, observaram-se inicialmente um aumento nas concentrações de ATP e ADP, seguido de uma redução na concentração dos nucleotídeos e nucleosídeos. Em relação à atividade da E-ADA, verificou-se uma redução na infecção pela cepa RH, e inicialmente para a cepa Me-49, porém a E-ADA aumentou suas atividades para esta cepa cistogênica no final do experimento. A avaliação das atividades da E-NTPDase e E-ADA levou a preposição de que seus comportamentos hidrolíticos estariam ligados a um mecanismo de proteção contra danos teciduais secundários, possivelmente gerados respostas exacerbadas a infecção pelo *T. gondii*. Adicionalmente, os dados da atividade da AChE, em amostras correspondentes, comprovaram o estabelecimento de uma resposta pró-inflamatória, corroborando com a hipótese da necessidade de um mecanismo de modulação. No tecido cerebral, a cepa RH repetiu o seu comportamento pró-inflamatório, e este comportamento pode ser analisado em longo prazo, no estudo que envolveu a cepa Me-49. Neste modelo, observou-se um aumento do ATP extracelular no início da infecção, como dados de histopatologia mostrando infiltrado inflamatório e a identificação de cistos teciduais tardiamente. Por fim, neste último período, observou-se uma diminuição na concentração das purinas, muito provavelmente em consequência da agravação da condição celular local em decorrência da evolução da infecção. Desta forma, foi possível se observar que existe uma participação direta dos sistemas purinérgico e colinérgico na imunomodulação da toxoplasmose experimental com cepas virulenta ou cistogênica, contribuindo para a instalação de uma resposta imune celular adequada ao parasito, e para um mecanismo de redução de danos teciduais associados a danos parasitários diretos e a resposta imune exacerbada.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*. Modulação inflamatória. E-NTPDase. E-ADA. AChE. BChE.



## ABSTRACT

Thesis

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PURINERGIC AND CHOLINERGIC COMPONENTS ON INFLAMMATORY AND NEUROLOGICAL PROCESSES IN RODENT EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Toxoplasma gondii***

AUTHOR: ALEXANDRE ALBERTO TONIN

ADVISER: Dr<sup>a</sup>. SONIA TERESINHA DOS ANJOS LOPES

Santa Maria, June, 6<sup>th</sup>, 2014.

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii*, often leading to functional, biochemical and structural changes, especially in the central nervous system. These changes are usually accompanied by a marked immune-inflammatory response, in immunocompetent hosts. Primary infections with *T. gondii* stimulate production of high levels of interleukins, such as IL-12 and IFN- $\gamma$ , by cells of the innate immune system, being central efforts to resistance to the disease. In terms of immune response, the purinergic and cholinergic systems have some well-defined properties, but we still without much information on the interrelation of these properties with toxoplasmosis. Thus, the objectives of this study were to evaluate the activities of the (1) E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes; (2) AChE on total blood and lymphocytes, and BChE on serum, using the RH (virulent) strain of *T. gondii*, with sampling on day 5 and 10 post-infection (pi); and (3) assess the purine levels and E-ADA activity in brain, using strains RH and Me-49 (cystogenic). First assessment's result demonstrated that the hydrolysis of ATP and ADP was increased, as well as the E-ADA activity also was increased. In the second experiment, there was an increase in AChE activity on lymphocytes and on whole blood. Finally, on the third experiment, it was found, in infection with RH, a significant increase of ATP, ADP, AMP, adenosine, hypoxanthine and xanthine levels, along with a reduction of inosine levels. Animals infected with the strain Me-49 showed increased concentrations of ATP and ADP, followed by a reduction of nucleotides and nucleosides levels. Regarding to E-ADA activity, it was observed a reduction on its activity on RH infection, and initially for Me-49 infection; however, E-ADA increased its activity, for this cystogenic at the end of the third experiment. The evaluations of E-NTPDase and E-ADA activities led to the preposition that their hydrolytic activity would be linked to a mechanism of protection against secondary tissue damage, possibly generated by an exacerbated response against *T. gondii* infection. Additionally, the data of AChE activity, in corresponding samples, confirm the onset of a pro-inflammatory response, corroborating with the hypothesis of necessity of a modulation mechanism. On brain tissue, the experimental model using RH strain repeated its pro-inflammatory pattern, with data of this pattern better observed in a long run, when the results of Me-49 study were evaluated. On Me-49 infection model, it was observed an increase in extracellular ATP, at the beginning of infection, with histopathology data showing inflammatory infiltrate and identification of tissue cysts later on the experiment. Finally, in this last period, it was observed a decrease in purine's concentration, most likely as a result of the aggravation of local cellular condition, due to the disease's evolution. Therefore, it was possible to observe that there was a direct involvement of purinergic and cholinergic systems on immunomodulation of experimental toxoplasmosis, with virulent or cystogenic strains, contributing to the establishment of an adequate immune response on the parasite, and also to a mechanism of tissue damage reduction, which is normally associated with direct parasite damage and excessive immune response.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*. Inflammatory modulation. E-NTPDase. E-ADA. AChE. BChE.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – Taquizoíto e Bradizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	32
FIGURA 2 – Oocisto esporulado e não esporulado de <i>T. gondii</i> .....	35
FIGURA 3 – Representação do ciclo biológico do <i>T. gondii</i> .....	36
FIGURA 4 – Esquema de reprodução do <i>T. gondii</i> por endodiogenia .....	37
FIGURA 5 – Mecanismos de defesa do hospedeiro frente a uma infecção pelo <i>T. gondii</i> .....	45
FIGURA 6 – Componentes da sinalização purinérgica .....	50
FIGURA 7 – Via colinérgica anti-inflamatória .....	59
FIGURA 8 – Mecanismos de liberação de Acetilcolina e interação com receptores .....	61

### CAPÍTULO I

FIGURA 1 – Hematocrit, total leukocytes and lymphocytes of rats infected with <i>T. gondii</i> ...	83
FIGURA 2 – Levels of immunoglobulins in rats infected with <i>T. gondii</i> .....	84
FIGURA 3 – E-NTPDase activity in lymphocytes of rats infected whit <i>T. gondii</i> .....	85
FIGURA 4 – E-ADA activity in lymphocytes of rats infected whit <i>T. gondii</i> .....	86
FIGURA 5 – E-NTPDase and E-ADA activity on lymphocytes of rats experimentally infected with <i>T. gondii</i> .....	87

### CAPÍTULO II

FIGURA 1 – AChE activity on blood and lymphocytes of rats infected whit <i>T. gondii</i> .....	105
--	-----

### CAPÍTULO III

FIGURA 1 – Levels of Purines on brain of mice infected with RH strain of <i>T. gondii</i> .....	130
FIGURA 2 – Levels of Purines on brain of mice infected with Me-49 strain of <i>T. gondii</i> ....	131
FIGURA 3 – E-ADA activity on brain of mice infected with strains RH and Me-49 of <i>T. gondii</i> .....	132
FIGURA 4 – Brain histopathology of mice experimentally infected with <i>T. gondii</i> .....	133



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

TABELA 1 – Hematological parameters of rats experimentally infected with <i>Toxoplasma gondii</i> .....	104
---	-----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima-A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADO	Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
AMP	Monofosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
CCR5	<i>C-C chemokine receptor-5</i>
CD	Célula Dendrítica
CD39	E-NTPDase, Ecto-difosfohidrolases ou Ecto-Apirases
CD73	E-5'-nucleotidase
CEIs	Células Epiteliais Intestinais
ChAT	Colina Acetiltransferase
E-ADA	Ecto-Adenosina Deaminase
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
E-NTPDases	Ecto-difosfohidrolases, CD39 ou Ecto-Apirases
HD	Hospedeiro Definitivo
HI	Hospedeiro Intermediário
HMGB1	<i>high mobility group box 1 protein</i>
HYPO	Hipoxantina
IEL	Linfócitos Intraepiteliais
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon-gama
INO	Inosina
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase induzida

mAChR	Receptor Colinérgico Muscarínico
Me49	Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> , tipo II, de característica de media patogenicidade
MIF	Fator Inibidor da Migração de Macrófagos
nAChR	Receptor Colinérgico Nicotínico
NF-κB	Fator Nuclear de transcrição <i>kappa</i> B
NK	<i>Natural Killer</i>
NK-1R	Receptores de Neuroquinina-1
NOS	Óxido Nítrico-Sintase
ON	Óxido Nítrico
p.i./PI	<i>Post infection</i> /Pós infecção
P2X	Receptor Purinérgico do tipo 2 ionotrópico
P2Y	Receptor Purinérgico do tipo 2 metabotrópico
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PMNs	Polimorfonucleares
RH	Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> , tipo I, de característica de alta patogenicidade
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RP1	Receptor Purinérgico do tipo 1
RP2	Receptor Purinérgico do tipo 2
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
spp	Espécies
TGF-β1	Fator Transformador de Crescimento Beta 1
TMI	Subunidade Alfa-Hélice transmembrana I dos P2X
TMII	Subunidade Alfa-Hélice transmembrana II dos P2X
TMs	Segmentos Transmembrana
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UDP	Uridina Difosfato
URIC	Ácido Úrico
UTP	Uridina Trifosfato
XAN	Xantina

## LISTA DE ANEXOS

### ANEXO I

E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii* - *Experimental Parasitology* – 135(2); 2013, 325-330.....175

### ANEXO II

Influence of infection by *Toxoplasma gondii* on the activity of cholinesterases during the acute phase of toxoplasmosis in Wistar rats - *Korean Journal of Parasitology* - 5(4); 2013, 421-426..... 176

### ANEXO III

Influence of infection by *Toxoplasma gondii* on purine levels and E-ADA activity in the brain of mice experimentally infected – *Experimental Parasitology* – 142 (2014) 51-58 ..... 177





# SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> (<i>T. gondii</i>)</b> .....	<b>31</b>
2.1.1 Introdução .....	31
2.1.2 Morfologia .....	32
2.1.2.1 Taquizoítos .....	32
2.1.2.2 Bradizoíto e cisto tecidual .....	33
2.1.2.3 Oocistos .....	35
2.1.3 Ciclo biológico e epidemiologia .....	36
2.1.3.1 Ciclo biológico .....	36
<b>2.1.3.2 Epidemiologia</b> .....	<b>39</b>
2.1.4 Cepas e importância clínica .....	43
2.1.5 Mecanismos de defesa do hospedeiro .....	44
2.1.6 Patogenia e fisiopatologia.....	48
<b>2.2 O Sistema purinérgico</b> .....	<b>50</b>
2.2.1 Receptores P1 e P2 .....	51
2.2.1.1 Receptores P1 (RP1).....	51
2.2.1.2 Receptores P2 (RP2).....	52
2.2.2 Funções dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina .....	53
2.2.2.1 O ATP.....	53
2.2.2.2 Adenosina (ADO).....	55
2.2.3 Ectonucleotidasas e Adenosina Desaminase .....	55
2.2.3.1 Ectonucleotidasas .....	56
2.2.3.2 E-ADA.....	57
<b>2.3 O Sistema colinérgico</b> .....	<b>58</b>
2.3.1 A Acetilcolina.....	58
2.3.2 As colinesterases .....	59
2.3.3 A via colinérgica anti-inflamatória.....	61
<b>3 CAPÍTULO I</b> .....	<b>65</b>
<b>3.1 Artigo 1</b> .....	<b>65</b>
<b>4 CAPÍTULO II</b> .....	<b>89</b>
<b>4.1 Artigo 2</b> .....	<b>89</b>
<b>5 CAPÍTULO III</b> .....	<b>107</b>
<b>5.1 Artigo 3</b> .....	<b>107</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>135</b>
<b>6.1 Avaliação enzimática periférica na toxoplasmose</b> .....	<b>135</b>
<b>6.2 Avaliação <i>in loco</i> na toxoplasmose</b> .....	<b>138</b>
6.2.1 Infecção pela cepa RH do <i>T. gondii</i> .....	139
6.2.2 Infecção pela cepa Me-49 do <i>T. gondii</i> .....	141

<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>145</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>173</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos publicados nas revistas científicas: *Experimental Parasitology* e *Korean Journal of Parasitology*, disponíveis nos capítulos I, II e III. A discussão traz um apanhado destes artigos, com suas interpretações discutidas sob um ponto de vista que buscou estabelecer uma conectividade entre os objetivos e resultados obtidos nos artigos que compuseram as bases científicas desta tese.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** se referem somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta tese.



# 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um membro do filo Apicomplexa, o qual compreende um diverso grupo de parasitos intracelulares, capaz de infectar um amplo número de hospedeiros e, ocasionalmente, causar doença severa em humanos e animais (HUNTER & SIBLEY, 2012). *T. gondii* pode parasitar praticamente todos os vertebrados de sangue quente, constituindo-se em uma causa frequente de infecção em animais de companhia e silvestres (DUBEY, 2007). Embora apresentando ampla adaptabilidade parasitária a diferentes hospedeiros, os felídeos, principalmente os gatos domésticos, são os únicos hospedeiros nos quais ocorre a reprodução sexuada, culminando com eliminação de oocistos nas fezes (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Estes oocistos, quando esporulados, podem contaminar a água e/ou alimentos, podendo causar infecção em uma ampla gama de animais (DUBEY, 2007).

No hospedeiro intermediário, a habilidade deste parasito em sofrer replicação assexuada, na forma de taquizoítos, permite uma rápida replicação e disseminação, principalmente através de fluídos corporais (DUBEY et al., 1998). Após uma vigorosa resposta do sistema imune, os taquizoítos são diferenciados em bradizoítos, os quais geralmente sobrevivem em estado semi-dormente no interior de cistos teciduais. O ciclo biológico se completa quando felídeos ingerem estes cistos (HUNTER & SIBLEY, 2012). Além disso, *T. gondii* é o único a ser transmitido assexuadamente em seres carnívoros ou onívoros, facilitando a sua disseminação entre os muitos potenciais hospedeiros (MOURA et al., 2006; JONES & DUBEY, 2012).

A resposta imune inata limita o crescimento e propagação do parasito, bem como promove o desenvolvimento de uma resposta adaptativa, a qual é requerida para manutenção do *status* de resistência à infecção frente ao protozoário, por longos períodos (TAIT & HUNTER, 2009). A imunidade protetora é específica e ocorre através dos mecanismos humoral e celular, com suas formas extracelulares diretamente afetadas por anticorpos, o que não acontece como as formas intracelulares do parasito (DUBEY et al., 1998). *T. gondii* se caracteriza por ativar uma marcante resposta imune celular (DENKERS & GAZZINELLI, 1998).

Uma vez evadida à resposta imune, a toxoplasmose pode causar, entre outros comprometimentos, a encefalite. Com a presença do parasito no sistema nervoso central

(SNC) podem ocorrer quadros de alterações comportamentais (SILVA et al., 2010; GATKOWSKA et al., 2012) possivelmente ligadas a alterações nas concentrações de neurotransmissores cerebrais (SKALLOVÁ et al., 2006; PRANDOVSKY et al., 2011). Em animais infectados, a encefalite é relacionada à presença de células inflamatórias no tecido, bem como a danos celulares resultantes da inflamação (FERGUSON & HUTCHISON, 1987a; CARRUTHERS & SUZUKI, 2007).

Por ser um potencial causador de zoonose, e de distribuição cosmopolita, *T. gondii* tem sido um dos protozoários mais amplamente estudados. Devido a estreita relação entre o parasito e a resposta imune, estudos que abordem esses aspectos se fazem extremamente importantes. Nesse sentido, é possível se estabelecer uma interessante correlação da resposta imuno-inflamatória e a invasão do SNC com os sistemas purinérgicos e colinérgicos.

Em se tratando de sinalização purinérgica, esta é conhecida por seu importante papel na modulação da resposta inflamatória e imunológica (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003), bem como pela participação na neurotransmissão (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004). Essas funções são particularmente desempenhadas pela participação de biomoléculas como os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP), e seu derivado nucleosídico adenosina (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Ambos, ATP extracelular e adenosina, são controlados por algumas ecto-enzimas, em especial pela *ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase* (E-NTPDase) e a *ecto-adenosine deaminase* (E-ADA), ancoradas extracelularmente (ZIMMERMANN, 2001).

No mesmo grau de importância, podemos colocar o sistema colinérgico, visto que este é uma das mais importantes vias modulatórias do SNC (DESCARRIES et al., 1997; PERRY et al., 1999). A sinalização colinérgica também está notavelmente envolvida em ações anti-inflamatórias (BOROVIKOVA et al., 2000, DAS, 2007). A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos SNC e sistema nervoso periférico (SNP), possuindo um papel crucial no SNC, associado com funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (SCREMIN et al., 1997). Os níveis de ACh são controlados pela ação das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (DAJAS-BAILADOR & WONNACOTT, 2004), presentes em tecidos colinérgicos e não colinérgicos, assim como no sangue e outros fluídos corporais. Devido a indiscutível importância zoonótica da toxoplasmose na saúde pública, e sua grande capacidade de estimulação das respostas imunoinflamatórias e colonização de órgãos e tecidos, em especial o SNC, estudos que procurem aprofundar os conhecimentos correlacionando esses aspectos

são de extrema valia. Neste sentido, buscou-se estabelecer a participação dos sistemas purinérgico e colinérgico em modelos experimentais da toxoplasmose, principalmente em relação à modulação dos processos imunoinflamatórios e nas consequências destas participações, sistemicamente e em nível de sistema nervoso central. Os resultados obtidos nos modelos experimentais utilizados serão expostos e discutidos no decorrer desta tese.





## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)

#### 2.1.1 Introdução

A toxoplasmose, considerada uma das parasitoses mais comuns no mundo acometendo animais homeotérmicos (DUBEY, 2009), é causada por um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa (LEVINE, 1970), classe Coccidia (LEUCKART, 1879), Ordem Eucoccidiorida (LÉGER & DUBOSCQ, 1910), Subordem Eimeriorina (LÉGER, 1911), Família Sarcocystidae (POCHE, 1913), subfamília Toxoplasmatinae (BIOCCA, 1956), Gênero *Toxoplasma* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909), Espécie *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909).

*T. gondii* é um protozoário descrito pela primeira vez em dois importantes institutos simultaneamente: por NICOLLE & MANCEUX em 1908, no Instituto *Pasteur* de Tunis na Tunísia, relataram o parasito em roedores (Gundi - *Ctenodactylus gundi*) da fauna local. No mesmo ano, no Instituto Biológico de São Paulo, SPLENDORE, descobriu o mesmo parasito em coelhos. Ambas as descobertas identificaram *T. gondii* inicialmente como *Leishmania*, porém NICOLLE & MANCEUX (1908) logo perceberam que haviam descoberto um novo organismo e o nomearam de *Toxoplasma gondii*, baseados na morfologia (*toxon* = arco, *plasma* = vida) e no hospedeiro (*gundi*). Em retrospecto, o correto nome do parasito deveria ter sido *Toxoplasma gundi*, porém NICOLLE & MANCEUX (1909) identificaram o hospedeiro erroneamente como “*Ctenodactylus gundi*”. SPLENDORE (1908), mesmo tendo identificado o parasito no mesmo período, não o denominou.

Desde a sua descoberta, até a década de 1930, somente os estágios assexuados (merozoíto e cisto tecidual) deste parasito eram conhecidos. Evidências com relação às características coccidianas foram observadas somente no final da década de 1960, revelando similaridade entre os merozoítos extra-intestinais e intestinais de *Eimeria* spp (TENTER et al., 2000). Apesar de ter sido identificado no início do século 20, só na década de 70 é que foram descritos os hospedeiros definitivos e intermediários (FRENKEL et al., 1970).

## 2.1.2 Morfologia

### 2.1.2.1 Taquizoítos

Os taquizoítos (do Grego *tachos* = veloz) foram primeiramente descritos por FRENKEL (1973), e representaram o estágio que NICOLLE & MANCEAUX (1909) inicialmente descreveram. São considerados os estágios de multiplicação e de disseminação rápida do protozoário, sendo capazes, teoricamente, de invadir todos os tipos de células dos vertebrados (DUBEY et al., 1998).

Esse estágio de multiplicação possui uma forma arqueada (Figura 1A), com aproximadamente 6µm de comprimento e 2µm de largura (Figura 1A), encontrados durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa ou forma livre (ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012). A fase aguda geralmente ocorre dentro de 8 a 12 dias pós-infecção, sendo os taquizoítos, capazes de atravessar barreiras teciduais como a hematoencefálica e placentária, podendo atingir o feto (WEISS & KIM, 2007).

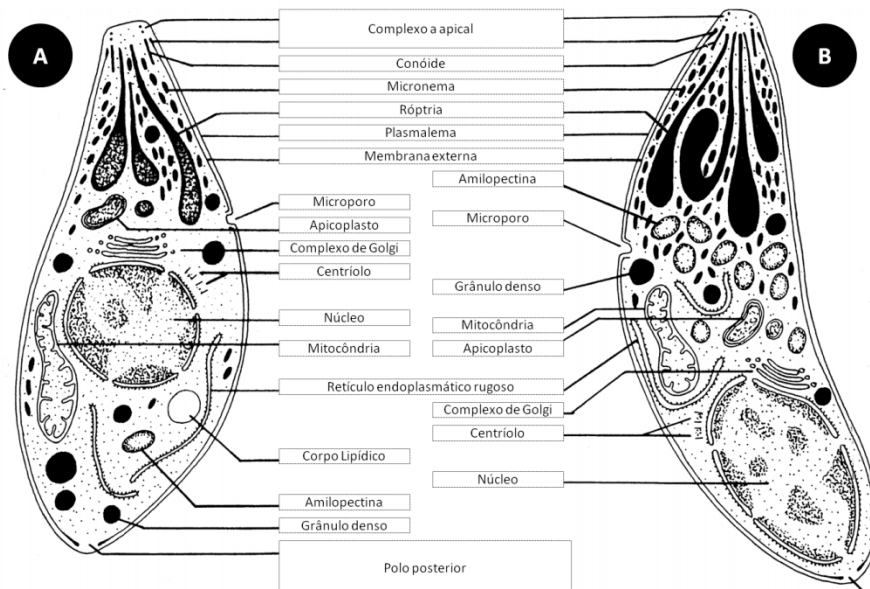


Figura 1: Taquizoíto (A) e Bradizoíto (B) de *Toxoplasma gondii*. Adaptada de DUBEY et al., (1998)

Os taquizoítos se multiplicam assexuadamente dentro da célula hospedeira por endodiogenia, uma forma especial de reprodução, pela qual, duas progênes são formadas dentro de uma célula mãe (DUBEY et al., 1998). A célula do hospedeiro se rompe quando não suporta mais o aumento do número de taquizoítos, com taxas de invasão e crescimento dependentes da cepa de *T. gondii* e tipo de célula hospedeira (DUBEY et al, 1998). Essas formas infectantes são as menos resistentes às condições ambientais adversas, ao suco gástrico, e à desidratação ou variações osmóticas (NEVES, 1995). Segundo ARAÚJO et al. (1998), sobrevivem no meio ambiente ou na carcaça de animais por poucas horas.

Morfológicamente, o taquizoíto possui duas regiões distintas: (I) a extremidade anterior afilada, onde se situa o complexo apical, formado por um conjunto de organelas específicas responsáveis pela penetração ativa nas células nucleadas e pela formação de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula parasitada; (II) o núcleo com membrana dupla, uma externa e contínua e a outra interna (HOWE & SIBLEY, 1995). No vacúolo parasitóforo, os taquizoítos se multiplicam rapidamente até que ocorra a ruptura da célula, culminando com a disseminação das formas livres via sistemas linfático e sanguíneo. Esta multiplicação pode favorecer à infecção de diversos locais do organismo, como o sistema nervoso central (SNC), olhos, musculatura esquelética, cardíaca e a placenta (HOWE & SIBLEY, 1995).

#### 2.1.2.2 Bradizoíto e cisto tecidual

O termo “bradizoíto” (do Grego *brady* = lento) foi proposto por FRENKEL (1973) para descrever o estágio de encistamento nos tecidos. Os bradizoítos (Figura 1B) também são conhecidos como cistozoítos. Para evitar confusões interpretativas, DUBEY & BEATTIE (1988) propuseram que os cistos deveriam ser chamados de cistos teciduais, para que se evitassem confusões com os oocistos. É difícil determinar quem primeiramente descreveu o estágio de cisto tecidual do parasito. LEVADITI et al. (1928) aparentemente foram os primeiros a relatar que *T. gondii* persistia em tecidos por muitos meses como “cistos”. FRENKEL & FRIEDLANDER (1951) e FRENKEL (1956) caracterizaram os cistos citologicamente, como um organismo de continuação do ciclo, com núcleo subterminal e com grânulos PAS (*periodic acid Schiff*) positivo, circundado por uma parede. WANKO et al. (1962) foram os primeiros a descrever a ultraestrutura dos cistos de *T. gondii* e seus conteúdos, ao passo que JACOBS et al. (1960) foram os primeiros a descrever as

características biológicas dos cistos. DUBEY & FRENKEL (1972) iniciaram os primeiros estudos sobre o desenvolvimento dos cistos teciduais e bradizoítos, abordando os aspectos relativos a ontogenia e morfologia.

Os bradizoítos diferem pouquíssimo dos taquizoítos, e são considerados como o estágio latente do parasito, consistindo a fase que marca o início da infecção crônica, na qual a multiplicação do parasito diminui de forma acentuada e a infecção pode ser mantida por um longo período (DUBEY et al., 1998). A reativação da infecção latente pode ocorrer em vários tecidos, mas o mais importante clinicamente é o sistema nervoso central (SNC), pelo risco do desenvolvimento de encefalite toxoplásmica (CARRUTHERS, 2002).

Os cistos teciduais crescem conforme os bradizoítos vão se dividindo por endodiogenia (FERGUSON & HUTCHISON, 1987a; 1987b), variando de acordo com seus tamanhos; cistos jovens tendem a ser menores (cerca de 5µm), contendo um a dois bradizoítos; ao passo que cistos mais velhos podem conter centenas de bradizoítos (DUBEY et al., 1998). Os cistos teciduais, no tecido cerebral, são geralmente esferoidais e raramente atingem diâmetros de 70 µm, enquanto os cistos intramusculares são alongados e podem atingir até 100 µm (DUBEY, 1977; 1993). Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais, incluindo pulmões, fígado e rins, eles são mais prevalentes nos tecidos neuronais e musculares, incluindo cérebro, olhos, músculos esqueléticos e cardíacos (DUBEY, 1988). Os cistos intactos podem permanecer viáveis por toda a vida do hospedeiro sem causar nenhuma reação inflamatória (DUBEY et al, 1998). Ainda não se conhece bem o(s) mecanismo(s) de persistência dos cistos teciduais, porém, é possível que os cistos rompam de tempos em tempos (não se sabe precisar a frequência) e os bradizoítos se transformem em taquizoítos, reinvadindo as células dos hospedeiros e, mais uma vez, se tornando bradizoítos dentro de um novo cisto (WEISS & KIM, 2007).

Segundo ARAÚJO et al (1998), essas formas sobrevivem nos tecidos por alguns dias depois da morte do hospedeiro, mas são destruídos pelo congelamento a -12°C por 24 horas ou cocção a 58°C por dez minutos. Essa forma de apresentação do parasito é o principal responsável pela transmissão dessa zoonose por meio do carnivorismo e ingestão de carne crua ou mal cozida (AMATO NETO et al., 1995).

### 2.1.2.3 Oocistos

Os oocistos são as formas resultantes do ciclo sexuado do parasito, que ocorre apenas no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos (NEVES, 1995). Os oocistos não esporulados (Figura 2A) são de aspectos subsféricos a esféricos e medem de 10 a 12 $\mu$ m de diâmetro. A esporulação ocorre no ambiente, fora do intestino do felino, em média de um a cinco dias após a excreção, estando dependente da temperatura e umidade (DUBEY et al, 1998). Os oocistos esporulados (Figura 2B) são de aspectos subsféricos a elípticos e medem 11 a 13 $\mu$ m de diâmetro. Cada oocisto contém dois esporocistos elípticos, medindo de 6 a 8 $\mu$ m de diâmetro, e cada esporocisto contém quatro esporozoítos (DUBEY et al, 1998).

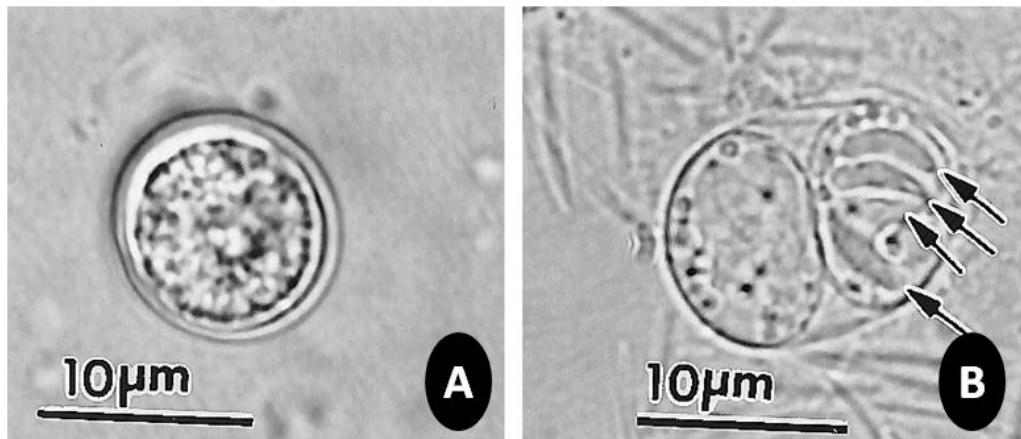


Figura 2: Oocisto de *Toxoplasma gondii*. (A) Oocisto não esporulado; (B) Oocisto esporulado, contendo dois esporocistos e quatro esporozoítos visíveis em um esporocisto (flechas). Fonte: DUBEY et al., (1998).

Os oocistos são resistentes a vários processos de inativação, permanecendo viáveis em ácido sulfúrico a 2%, ou em dicromato de potássio a 2,5%, por vários anos, a uma temperatura de 4°C. Também são resistentes a soluções desinfetantes, como hipoclorito de sódio (DUBEY, 1998). Como são resistentes a agentes químicos e físicos, os oocistos infectantes do parasito podem estar presentes nos alimentos e na água. Ainda, segundo DUBEY (1998), os oocistos podem sobreviver na água a uma temperatura de -20°C por até 28 dias e, até 360 dias a uma temperatura de 37°C, podendo permanecer viáveis por até dois anos no ambiente.

### 2.1.3 Ciclo biológico e epidemiologia

#### 2.1.3.1 Ciclo biológico

O ciclo biológico do *T. gondii* (Figura 3) é do tipo heteroxeno, pois envolve duas fases distintas, uma sexuada, que só ocorre nos hospedeiros definitivos (HD) (FRENKEL et al., 1970), e uma assexuada, que ocorre tanto nos HD quanto nos hospedeiros intermediários (HI). Animais pertencentes à família Felidae (notadamente os gatos domésticos) são os HD, ao passo que os HI podem ser qualquer animal de sangue quente, incluindo os pássaros, herbívoros e carnívoros terrestres (roedores, animais de caça, animais de produção e o homem), além de mamíferos marinhos (baleias e golfinhos) (DUBEY, 2002).

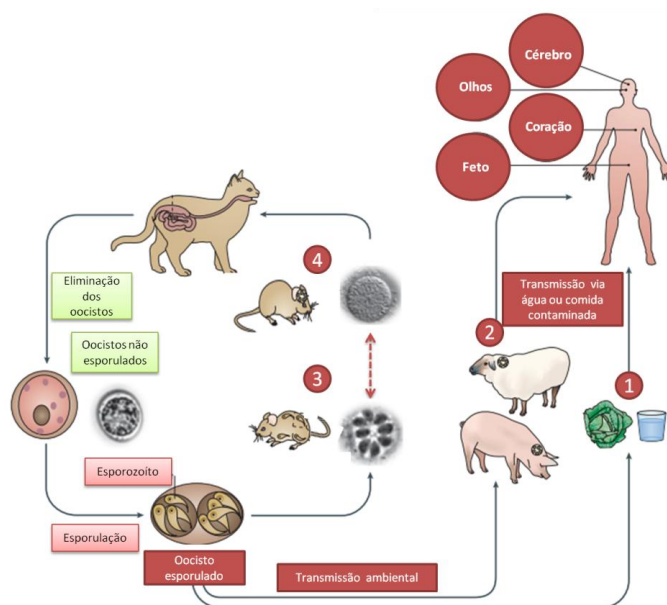


Figura 3: Representação do complexo ciclo biológico do *Toxoplasma gondii* (Adaptada de HUNTER & SIBLEY, 2012). (1) Infecção por oocistos esporulados; (2) Infecção por cistos teciduais contendo bradizoítos; (3) fase aguda com a presença de taquizoítos; e (4) fase crônica com a presença de cistos teciduais contendo bradizoítos.

Os felídeos podem eliminar oocistos depois de ingerir qualquer um dos três estágios infectivos do *T. gondii*, taquizoíto, bradizoíto e oocisto esporulado (WEISS & KIM, 2007). O período pré-patente e frequência de eliminação de oocistos varia de acordo com o estágio

ingerido (DUBEY & FRENKEL, 1976; FREYRE et al., 1989; DUBEY, 1996). De modo geral, o período pré-patente é de 3 a 10 dias após ingestão de cisto tecidual,  $\geq 18$  dias após ingestão de oocistos esporulados (DUBEY, 1996), e  $\geq 13$  dias após a ingestão de taquizoítos (DUBEY, 1998). Menos de 30% dos gatos eliminam oocistos após a ingestão de taquizoítos ou oocistos, ao passo que quase que uma alta porcentagem dos gatos eliminam oocistos após a ingestão de cistos teciduais (DUBEY & FRENKEL, 1976; DUBEY, 1996).

Após a ingestão de cistos teciduais, taquizoítos, oocistos esporulados via água e/ou alimentos, ou taquizoítos eliminados no leite é iniciado o ciclo extraintestinal, tecidual, sistêmico, merogonia, ou fase assexuada (FORTES, 1997; DUBEY et al., 1998). Os taquizoítos são os menos resistentes e podem ser destruídos pela ação do suco gástrico, mas caso consigam penetrar a mucosa oral ou serem inalados, apresentam a mesma evolução que as outras formas de parasito (DUBEY et al., 1998). Esta fase pode ocorrer, além de nos felídeos, em qualquer HI. Ao atingirem a luz do tubo gastrintestinal e atravessarem a mucosa, os esporozoítos, bradizoítos, ou taquizoítos multiplicam-se rapidamente no meio intracelular por endodiogenia (Figura 4), como taquizoítos (ou merozoítos, como também chamados nesta fase). Estes invadem vários tipos celulares dos organismos e formam vacúolos parasitóforos, no interior do qual se dividem também por endodiogenia. Esse processo origina novos merozoítos, os quais promoverão a lise da célula infectada e invadirão novas células, iniciando o desenvolvimento de inúmeras gerações de merozoítos de *T. gondii* (WEISS & KIM, 2007). Cinco (05) tipos, morfologicamente distintos, de merozoítos se desenvolvem nas células epiteliais intestinais antes do início da gametogênese (DUBEY & FRENKEL, 1972). Estes estágios são designados do tipo A a E e consistem na fase assexuada de multiplicação do parasito (WEISS & KIM, 2007).

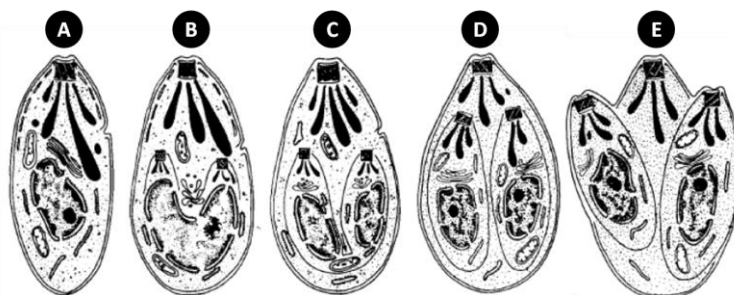


Figura 4: Esquema de reprodução do *Toxoplasma gondii* por endodiogenia. (A) trofozoíto; (B) início da formação de dois conóides filhos e núcleos em aspecto de “U”; (C) completa divisão nuclear e individualização dos trofozoítos filhos; (D) separação dos dois novos trofozoítos; (E) rompimento da célula mãe com liberação dos novos taquizoíto (ou merozoítos). Adaptada de REY (2001).

De acordo com DUBEY (1998), em aproximadamente duas semanas, o hospedeiro começa a desenvolver imunidade, o que faz com que a taxa de multiplicação do parasito diminua. Os bradizoítos se confinam no citoplasma das células, em cistos, ficando protegidos das ações do sistema imune, permanecendo viáveis por muitos anos (em estado latente) (WEISS & KIM, 2007). Segundo BHOPALE (2003), os mecanismos que promovem a interconversão de taquizoítos para bradizoítos no *T. gondii* são ainda pouco entendidos.

Nos felídeos, além do ciclo assexuado, pode ocorrer o ciclo sexuado, gametogonia ou ciclo enteroepitelial (DUBEY, 1998). Após os mecanismos descritos para o ciclo assexuado, e a formação de inúmeras gerações de *T. gondii* (tipos A a E, como descrito anteriormente), o ciclo sexuado começa geralmente dois dias após a ingestão dos cistos teciduais pelo felino, variando em relação a cada tipo.

A origem dos gametas ainda não foi determinada, porém esses são encontrados em todo o intestino delgado, principalmente no íleo, de 3 a 15 dias após inoculação (DUBEY et al, 1998). Alguns merozoítos originam macrogametas, e outros, microgametas. O macrogameta (imóvel) permanecerá dentro de uma célula epitelial, enquanto os microgametas (móveis e flagelados) irão fecundar o macrogameta (WEISS & KIM, 2007). A fecundação ocorre na célula da parede intestinal, com a união dos dois núcleos, resultando na formação de um ovo ou zigoto que, após segregar a parede cística, dá origem ao oocisto. As células epiteliais infectadas se rompem, liberando os oocistos no lúmen intestinal, para em seguida serem eliminados junto com as fezes dos felídeos, de cinco a dez dias após o momento em que o animal foi infectado, podendo a eliminação de oocistos permanecer por 1 a 2 semanas (DUBEY, 1994; MILLER, 1997).

Nessa fase, um felídeo pode eliminar cerca de 100.000 oocistos por grama de fezes, entretanto, os oocistos devem esporular para se tornarem infectantes (DUBEY, 1994). Esse processo pode levar de 1 a 5 dias após a excreção, passando o oocisto a conter dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. A esporulação ocorre no ambiente sendo dependente da temperatura e umidade (DUBEY, 1994; DUBEY et al, 1998). Após a maturação, os oocistos podem permanecer por meses e até anos viáveis no ambiente numa temperatura entre  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , desde que não expostos à luz solar direta, e em condições razoáveis de umidade relativa (DUBEY & FRENKEL, 1972).

O homem, como HI, pode se infectar por via oral, transplacentária, através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, e transmissão acidental por auto-inoculação em laboratório. A infecção por via oral pode ocorrer através de: ingestão de oocistos esporulados presentes em alimentos e água contaminados, caixas de areia, ingestão de cistos contendo



bradizoítos, encontrados em carne crua ou mal cozidos; ingestão de taquizoítos em leite contaminado (WEISS & KIM, 2007). A partir deste ponto, o ciclo é semelhante ao descrito para gatos, na fase assexuada. É importante ressaltar que, a disseminação do parasito ocorre através de taquizoítos livres na linfa ou no sangue circulante, podendo levar a um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, cepas do parasito e da suscetibilidade do hospedeiro (AMATO & MARCHI, 2002). Essa fase inicial da infecção – fase proliferativa – caracteriza a fase aguda da doença. Neste ponto, a evolução poderá levar a morte do hospedeiro, como muitas vezes ocorre em fetos ou em indivíduos com comprometimento imunológico, ou a intensidade pode diminuir e a doença cessar, principalmente pelo aparecimento de resposta imune específica. Com o aparecimento desta imunidade, os parasitos extracelulares desaparecem do sangue, linfa e dos órgãos viscerais, ocorrendo uma diminuição intracelular (AMATO & MARCHI, 2002).

Alguns taquizoítos, no entanto, ao invadirem as células, desenvolvem uma cápsula cística na parede do vacúolo parasitóforo, diminuindo seu metabolismo e se transformando em sua forma de metabolismo lento, os bradizoítos. Por conta da resposta imunológica formada no ato da infecção, os bradizoítos permanecem no interior destes cistos sem despertar sintomatologia significativa no hospedeiro, por meses, anos e provavelmente décadas (DUBEY & FRENKEL, 1976). A resposta imunológica limita a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradicam os cistos já existentes encontrados em múltiplos órgãos. Estes constituem as formas de resistência do parasito, que ocasionalmente ao se romper, liberam os bradizoítos (WEISS & KIM, 2007). Uma vez liberados, os bradizoítos podem evoluir a taquizoítos e reinfetar células vizinhas, com magnitude de infecção dependente de fatores imunológicos/inflamatórios (KAWAZOE, 2002).

### **2.1.3.2 Epidemiologia**

O homem pode se infectar por três vias: I. Ingestão de oocistos já esporulados no meio ambiente (solo, areia, água); II. Ingestão de cistos teciduais viáveis presentes na carne (sobretudo cruas e mal cozidas), ou em subprodutos destas; e III. Infecção transplacentária (FRENKEL, 1970; FRENKEL, 1973). Por ser um parasito que apresenta distribuição cosmopolita, estima-se que um terço, ou mais, da população mundial esteja cronicamente infectada, apresentando anticorpos para o parasito (MONTROYA & LIESENFELD, 2004),

chegando a índices de soropositividade variando de 23 a 83%, dependendo de fatores climáticos, socioeconômicos e culturais (FIALHO et al., 2009). No Brasil, a prevalência varia de 50% a 80%, atinge níveis estimados em 16% nos Estados Unidos, 80% na França e África Central e 10% na Austrália (FREEMAN et al., 2005). Se considerarmos a gestação como um dos maiores fatores de risco, alguns dados mostram que, por exemplo, nos Estados Unidos 15 a 50% das mulheres na fase reprodutiva são imunes, sendo que a incidência de toxoplasmose congênita varia de 1 por 10.000 a 10 por 10.000 nascidos vivos, o que acarreta em 400 a 4000 casos novos por ano (PEYRON, 1996; RUDIN et al., 2008). Na França, a prevalência de soropositividade entre essa população de mulheres é de 65 a 80%, ao passo que, no Brasil, estima-se uma prevalência de soropositividade de anticorpos IgG para toxoplasmose de 60 a 75% entre mulheres em idade fértil (PEYRON, 1996). Infecções primárias em adultos são geralmente assintomáticas, mas linfadenopatia ou toxoplasmose ocular podem ocorrer em alguns pacientes (SU et al., 2010). Já para os imunossuprimidos, a toxoplasmose se apresenta de forma aguda, podendo em alguns casos levar a encefalite fatal, ou neurotoxoplasmose, e provocar lesões necróticas no cérebro (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

Os animais domésticos apresentam grande importância como hospedeiros intermediários do *T. gondii*, por serem transmissores passivos da toxoplasmose, consistindo em uma importante ferramenta epidemiológica de estudos e monitoramento da doença. As galinhas (*Gallus gallus*), por exemplo, podem servir como indicadores de contaminação ambiental, já que têm grande exposição aos oocistos (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2009), infectando-se facilmente pelo protozoário (RUIZ & FRENKEL, 1980). Dessa forma, o parasito tem sido detectado significativamente em tecidos de galinhas soropositivas (DA SILVA et al., 2003; LEHMANN et al., 2006), mais frequentemente encontrado em galinhas caipiras do que em galinhas criadas de forma intensiva, uma vez que as primeiras estão mais expostas à contaminação ambiental por oocistos (DUBEY et al., 2005; DUBEY, 2010).

Em relação a ruminantes, os ovinos e caprinos são particularmente vulneráveis à infecção, com soroprevalência acima de 90% em ambientes contaminados (TENTER et al., 2000; SAMRA et al., 2007). A associação de *T. gondii* com perdas reprodutivas em pequenos ruminantes, constitui, talvez, a maior indício clínico da doença (PESCADOR et al., 2007). Em relação ao comprometimento da qualidade e consumo da carne, em ovelhas soropositivas é possível de ser encontrado um grande número de cistos teciduais (DUBEY & JONES, 2008). Epidemiologicamente, estudos recentes relatam que idade, sexo, sistema de manejo, contato com felinos, suplementação mineral e tipo de alimentação estão relacionados a fatores

de risco para infecção toxoplásmica em ovinos (NETO et al., 2008; PINHEIRO JUNIOR et al., 2009; LOPES et al., 2010).

Ainda, em se tratando de ruminantes, os bovinos, mesmo sendo considerados susceptíveis à infecção, mostram-se resistentes à doença induzida por *T. gondii* (ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1997) e, portanto, não considerados como bons hospedeiros. Embora os bovinos possam ser infectados com sucesso com oocistos de *T. gondii*, o parasito é eliminado ou reduzido a níveis não detectáveis em poucas semanas (DUBEY & JONES, 2008). Em relação a estudos epidemiológicos sobre a frequência da infecção em bovinos no Brasil, é possível afirmar que a toxoplasmose se encontra amplamente disseminada nos rebanhos, embora as porcentagens possam variar de acordo com a região. A alta prevalência de anticorpos anti-*T.gondii* em amostras de soro de bovinos vem sendo relatada desde 1978 por COSTA et al. (1978) que através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), encontraram 32,3% de soropositivos no estado de São Paulo e 12% de reagentes em Minas Gerais. COSTA et al. (2001), ao analisarem o soro de bovinos provenientes de áreas rurais de São Paulo e Minas Gerais, e DAGUER et al. (2004) no estado do Paraná, ambos por meio da RIFI, observaram, respectivamente, que 49,1% e 41,4%, dos bovinos foram sororeagentes, considerando positivos os soros com titulação maior ou igual a 1:64.

Da mesma maneira que os bovinos, os equinos também apresentam características de resistência à infecção, porém estes parecem ser uma das espécies mais resistentes ao desenvolvimento clínico da toxoplasmose (AL-KHALIDI & DUBEY, 1979). Embora o consumo de carne equina não tenha uma importância epidemiológica significativa mundialmente, em um estudo realizado na Itália, o parasita foi detectado em 90% das amostras de carne analisadas. Visto que em alguns países o consumo de carne equina crua, ou mal passada, é um hábito, estes dados podem demonstrar uma importante informação na epidemiologia do *T. gondii* (TASSI, 2007). Em relação a dados nacionais, tem-se mostrado que a prevalência varia de acordo com a localidade. Assim, na região centro-oeste existe uma variação de 13,7% a 32,8% de animais anticorpo-positivos (LARANJEIRA et al., 1985; VIDOTTO et al., 1997); na região sudeste o percentual encontra-se entre 4,42% a 41,5% (COSTA et al., 1986; VIDOTTO et al., 1997) e na região sul 12,1% a 23,4% (VIDOTTO et al., 1997; GARCIA et al., 1999).

Com relação à presença e importância do *T. gondii* na suinocultura, FIALHO et al. (2009) relataram uma prevalência de anticorpos anti-*T.gondii* em suínos no sul do Brasil variando de 1,16% a 42,85%. A importância da toxoplasmose suína, além da questão clínica, está relacionada às perdas reprodutivas e às implicações em saúde pública, uma vez que

estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de cistos teciduais em carne crua, ou mal cozida, seja uma importante via de transmissão do *T. gondii* para a população humana (FIALHO & ARAÚJO, 2003). Ainda, em algumas localidades no Brasil, a ingestão de embutidos artesanais preparados com carne suína, constituiu-se em uma via de transmissão bastante significativa, não só para os indivíduos que ingerem, mas também para aqueles que estão envolvidos com a sua preparação (SPALDING et al., 2005).

Em relação à toxoplasmose em cães, podemos dizer que desde o primeiro caso fatal de toxoplasmose canina descrita por MELLO (1910) em um cão na Itália, houveram muitos outros relatos até 1988 (DUBEY, 2009). Porém, nos últimos 25 anos, tem-se notado uma redução no número de casos, o que pode ser devido a presença do protozoário *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1988), o qual na maioria das vezes era classificado erroneamente como *T. gondii*, devido as suas características bastante similares (DUBEY, 2009). Em relação a dados nacionais, FIALHO et al. (2009) relataram uma variação na frequência de detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cães de 4,96% a 84,1%, no sul do Brasil.

Todos os gatos domésticos são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, embora animais mais jovens, com até um ano de idade, possam excretar um número maior de oocistos nas fezes após terem ingerido cistos teciduais contendo o parasito (LINDSAY et al., 1997). Gatos adultos, primoinfectados, também eliminam oocistos, porém em menor quantidade e por um período mais curto (LINDSAY et al., 1997). Embora a maioria dos gatos que já tiveram contato com *T. gondii* desenvolva imunidade e não volte a excretar significativas quantidades de oocistos, DUBEY & FRENKEL (1974) comprovaram que felinos soropositivos, frente a um quadro de imunossupressão, podem reiniciar uma grande eliminação de oocistos. Posteriormente DUBEY (1995), em um estudo experimental, reinfectou gatos comprovadamente soropositivos (seis anos após terem soro-convertido), e 55% desses reexcretaram oocistos nas fezes, porém em quantidades bem inferiores em relação à primoinfecção. Um fator complicador na clínica de felinos é o fato de que a maioria dos gatos infectados é assintomático, manifestando-se a toxoplasmose clínica frequentemente como pneumonia. Gatos que subsequentemente morrem em decorrência da toxoplasmose, geralmente apresentam como sinais clínicos mais comuns a depressão e a anorexia (DUBEY, 2008). Por fim, em relação a questões epidemiológicas, em um levantamento de pesquisas relacionadas com a frequência de anticorpos anti-*T.gondii*, em diferentes espécies animais na região sul do Brasil, pode-se observar que em felinos a frequência de anticorpos varia de 10,2% a 84 % (FIALHO et al., 2009).

#### 2.1.4 Cepas e importância clínica

Apesar da presença de um ciclo sexuado, *T. gondii* tem uma estrutura populacional altamente clonal, ou seja, possui o genótipo numericamente pequeno e estável em tempo e espaço (KHAN et al., 2011). Essa estabilidade pode ser explicada por dois aspectos principais: primeiro, a possibilidade de transmissão entre os hospedeiros intermediários através do carnivorismo, dispensando o ciclo sexuado que ocorre nos felinos; e segundo, o fato do *T. gondii* ser haploide, permitindo que um felino infectado por uma única cepa excrete oocistos que darão origem a microrganismos geneticamente idênticos à cepa original (BOOTHROYD & GRIGG, 2002).

A classificação das linhagens clonais é baseada no polimorfismo de fragmentos do DNA gerados com enzimas de restrição - *Restriction Fragment Length Polymorphism* – (RFLP) e distinguia até poucos anos atrás três principais linhagens clonais (ou genótipos) designados como tipos (linhagens) I, II e III, e capazes de infectar tanto homem quanto os animais (WONG & REMINGTON, 1993, DARDÉ & AJZENBERG, 2003, DUBEY et al., 2003). O padrão de três linhagens foi mantido até 2011, quando KHAN et al. (2011) relataram uma quarta linhagem na América do Norte, referindo esta como “tipo 12”. A clonalidade do *T. gondii* é fortemente evidente na América do Norte e Europa, onde as linhagens (NICOLLE & MANCEAUX, 1908; LEVINE, 1988; DUBEY, 2010) compreendem a maioria dos isolados (SIBLEY & AJIOKA, 2008). Na América do Sul, devido a uma maior diversidade genética, a possibilidade de novas recombinações gênicas é mais frequente (KHAN et al., 2006; LEHMANN et al., 2006; KHAN et al., 2007; PENA et al., 2008).

As linhagens diferem quanto a sua virulência, comportamento biológico e padrões epidemiológicos de ocorrência. Existe uma predominância de cepas do tipo II na toxoplasmose humana, e a frequência do tipo III é mais elevada em animais (HOWE & SIBLEY, 1995; GRIGG et al., 2001; DIANA et al., 2004; VILLENA et al., 2004). Em humanos, a possibilidade de o genótipo influenciar a gravidade da doença é observada experimentalmente através da expressão da virulência em animais. As linhagens de *T. gondii* tipo I são extremamente virulentas, produzindo altos níveis de parasitemia, com aumento do risco de transmissão transplacentária, aumento da morbidade e mortalidade em fetos em desenvolvimento. As linhagens dos tipos II e III levam à cronificação da infecção e produção de cistos teciduais (HOWE & SIBLEY, 1995). A quarta linhagem clonal, foi recentemente

descrita por KHAN et al., (2011) em animais de vida selvagem, carecendo ainda de uma melhor classificação fisiopatológica.

A cepa padrão virulenta RH (SABIN, 1943) é classificada como do tipo I e pode ser considerada a mais patogênica. Dessa forma, essa é a cepa utilizada com mais frequência nas pesquisas e no diagnóstico, devido as suas características de rápida replicação, alta produtividade e eficiência em romper as células do hospedeiro, facilitando o isolamento de um grande número de taquizoítos. Outras cepas padrão, tais como a Me49 (tipo II) e VEG (tipo III) tem sido empregadas em estudos relacionados à infecção latente, já que são caracterizadas por uma menor patogenicidade e pela formação de cistos (ROOS, et al., 1994).

#### 2.1.5 Mecanismos de defesa do hospedeiro

Os mecanismos de defesa do hospedeiro exercem um papel crucial no controle da atividade do *T. gondii*. A imunidade protetora é específica e ocorre através dos mecanismos humoral e celular, sendo as formas extracelulares diretamente afetadas por anticorpos, o que não acontece como as formas intracelulares do parasito (DUBEY et al., 1998). De acordo com DENKERS & GAZZINELLI (1998) esse protozoário se caracteriza por ativar uma marcante resposta imune celular (Figura 5). Uma característica dessa resposta é que praticamente não existe imunopatologia associada, apresentando como sintomas mais comuns febre e linfadenopatia. A resposta imune induz a elevação da temperatura corpórea, um sinal de formação dos cistos teciduais (DUBEY et al., 1998).

Inicialmente, o controle da infecção aguda causada pelo *T. gondii* deflagra resposta inata, seguida por resposta adquirida antígeno-específico, que é particularmente crítica para a resolução da infecção por taquizoítos (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Neste sentido, as células epiteliais representam a primeira barreira da resposta imune inata do hospedeiro frente à infecção oral pelo *T. gondii*. Durante infecções naturais, o protozoário inicialmente atravessa o epitélio intestinal (Figura 5A), disseminando-se, e com isso invadindo barreiras biológicas, tais como a hematoencefálica, placenta e retina (BARRAGAN & SIBLEY, 2003). Dessa maneira, os enterócitos têm uma participação crucial, atuando como “sentinelas” contra a invasão pelo parasito. Os enterócitos têm a capacidade de atuar como “imunócitos”, principalmente pela regulação da ativação de marcadores associados com a apresentação de antígenos (WEISS & KIM, 2007). Nesse sentido, um dos principais mecanismos utilizados

pelo hospedeiro para o controle e remoção do agente presente no intestino é a indução do óxido nítrico (ON), uma molécula antimicrobiana secretada pelo epitélio intestinal (Figura 5B). Outro mecanismo importante diz respeito à ativação dos enterócitos com interferon-gama (INF- $\gamma$ ), inibindo a proliferação do *T. gondii*. Alguns estudos indicam que o INF- $\gamma$  parece atuar impedindo a replicação do parasito pela limitação da disponibilidade de ferro intracelular ao *T. gondii* (DIMIER & BOUT, 1998).

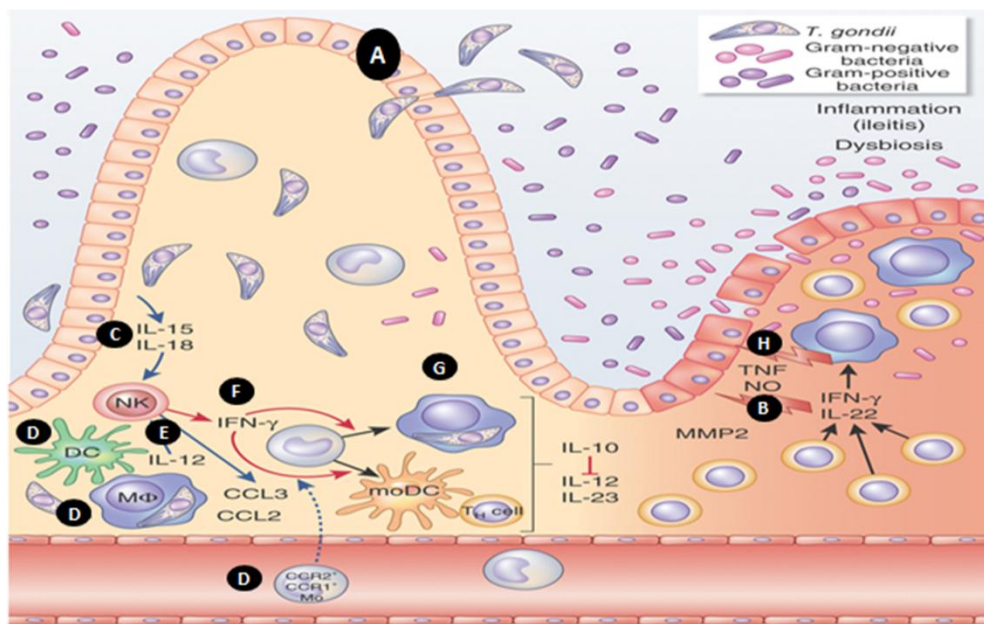


Figura 5. Mecanismos de defesa do hospedeiro frente a uma infecção pelo *Toxoplasma gondii*. A) Invasão do epitélio pelo parasito; B) Secreção de óxido nítrico (NO) pelas células epiteliais; C) Secreção de citocinas pelas células epiteliais e ativação de células *natural killer* (NK); D) quimioatração de polimorfos nucleares, macrófagos ( $M_{\phi}$ ) e células dendríticas (DC) para o local da invasão; E) Liberação de IL-12 pelos  $M_{\phi}$  e DC, que atua sobre NK estimulando a liberação de INF- $\gamma$ ; F) INF- $\gamma$  ativará um maior número de  $M_{\phi}$  e DC; G) Utilização de  $M_{\phi}$  e DC pelo *T. gondii* como “vetores”, facilitando a disseminação do parasito; H) TNF- $\alpha$  produzido pelos  $M_{\phi}$  e DC ativados aumenta a produção e liberação NO. Adaptada de GOLDSZMID & TRINCHIERI (2012).

Outra linha de defesa na resposta imune inata são as quimiocinas secretadas (Figura 5C) na superfície basolateral das células epiteliais intestinais (CEIs), as quais iniciam e também modulam a resposta imune a vários patógenos, incluindo o *T. gondii*. As CEIs do tecido intestinal inflamado secretam citocinas e quimiocinas próinflamatórias, responsáveis pela quimioatração (Figura 5D) de macrófagos, monócitos, neutrófilos e/ou linfócitos (WEISS & KIM, 2007). Os neutrófilos (ou polimorfonucleares – PMNs) representam uma resposta precoce, liberando uma grande gama de citocinas, tais como o fator de necrose

tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL) como, por exemplo, a IL-12, e quimiocinas pró-inflamatória, em resposta a infecção pelo *T. gondii* (BLISS et al., 1999). Existe ainda um mecanismo de *feedback* positivo pelo qual as CEIs secretam quimiocinas e estas, por sua vez recrutam mais PMNs para os locais de infecção (KELLY et al., 2005). Uma vez recrutados, os PMNs podem participar na atração e migração de outras células imunes, tais como as células dendríticas (CD), as quais geralmente participam servindo como um *link* à resposta imune inata e adaptativa (WEISS & KIM, 2007).

Em adição aos PMNs, as CD (ALIBERTI et al., 2003), bem como os macrófagos (OLIVEIRA et al., 2000), produzem também IL-12 (Figura 5E) em resposta à infecção, desempenhando um importante papel na imunidade celular em resposta a patógenos intracelulares, e na resposta imune específica tipo I. A interação de antígenos do parasito via receptor de quimiocinas CCR5 (*C-C chemokine receptor-5*) induz a síntese de IL-12, que, por conseguinte, acaba estimulando a síntese de INF- $\gamma$  (Figura 5F) pelas células *natural killer* (NK) e linfócitos T durante a infecção pelo *T. gondii* (SHER et al., 2003). Além de produzir a IL-12, as CD (juntamente com os macrófagos) produzem também a IL-15, uma interleucina que possui funções pleotrópicas, caracterizando uma interface entre as respostas imune inata e adaptativa (WEISS & KIM, 2007), principalmente por ser necessária para a diferenciação e/ou manutenção homeostática de três subconjuntos de linfócitos ligados à resposta imune inata: as NK, *Natural Killer T* (NKT) e linfócitos intraepiteliais CD8 $\alpha\alpha$  (IEL). Como já mencionado, as NK são conhecidas pela produção de INF- $\gamma$  e também por sua ação citotóxica, auxiliando nos mecanismos de resistência ao *T. gondii* (TATO et al., 2003). Em relação às NKT, estas têm uma participação importante na eliminação do parasito, principalmente pela mudança para uma resposta do tipo Th1, que, quando exacerbada, pode levar a manifestações imunopatológicas. Desta forma, as NKT são importantes células na regulação da diferenciação Th1/Th2 (RONET et al., 2005).

Ainda, em se tratando de CD, outra de suas principais e primordiais funções (embora ainda não completamente elucidada na toxoplasmose) é a apresentação de antígeno. Esta função, embora extremamente necessária, acaba também contribuindo para a disseminação do protozoário para outros locais, como por exemplo, o cérebro (DUBEY, 1997). *T. gondii* pode eficientemente penetrar e sobreviver no interior das CD (CHANNON et al., 2000), e devido a plasticidade e propriedades migratórias das CD, esse parasito pode utilizar as CD como “vetores” de disseminação (Figura 5G), levando a importantes implicações clínicas devido a contribuição para o estabelecimento da infecção crônica.



Os macrófagos, da mesma forma, são extremamente importantes na resposta imune inata contra esse protozoário, principalmente por possuírem uma potente função antimicrobiana, e um eficiente processamento e apresentação de antígenos (peptídeos) para a ativação dos linfócitos T (induzindo a imunidade adquirida), via complexo de histocompatibilidade (MHC) e co-estimulação de moléculas (WEISS & KIM, 2007). Essa importante função microbiana é adquirida pela ativação dos macrófagos pela ação do INF- $\gamma$ , a qual parece ser dependente de dois fatores. O primeiro é constituído pela privação do triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasito. A estimulação da isoforma II (ou óxido nítrico-sintase induzida [iNOS]) da enzima Óxido Nítrico-Sintase (NOS), é outro mecanismo gerado pelos macrófagos ativados pelo INF- $\gamma$ . A indução da iNOS leva a uma produção de espécies reativas de nitrogênio, tóxicas ao parasito. Neste ponto, outro mecanismo compensatório, ou de *feedback* positivo se forma, pois estes macrófagos ativados pelo INF- $\gamma$ , sintetizam TNF- $\alpha$  (Figura 5H), que por sua vez, aumentam a produção de iNOS (LIESENFELD et al., 1999). Porém, esses mecanismos de ativação e auto-regulação podem levar a uma superprodução de ON, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , contribuindo para uma situação de inflamação exacerbada no tecido epitelial intestinal, que quando foge do controle, pode contribuir com a morte do hospedeiro (LIESENFELD et al., 1999).

O interessante é que *T. gondii* tem adotado estratégias para a subversão das funções antimicrobianas dos macrófagos. Esses mecanismos de subversão celular são provavelmente dedicados à necessidade de minimizar as funções antimicrobianas dos macrófagos, bem como evitar mecanismos pró-inflamatórios que poderiam causar uma instabilidade na relação parasito-hospedeiro (DENKERS & BUTCHER, 2005). Dessa maneira, a invasão de macrófagos por *T. gondii* viáveis muitas vezes é acompanhada de uma rápida supressão na síntese de TNF- $\alpha$  e IL-12, concomitante com uma estimulação à produção de fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e IL-10 (BUTCHER et al., 2005).

Anticorpos contra o parasito são prontamente sintetizados em resposta a infecção (FRENKEL et al., 1991). Porém a imunidade mediada pelos anticorpos, ou resposta ligada a linfócitos B (LB), é bastante discutida, principalmente pelas variadas respostas encontrada em modelos experimentais (WEISS & KIM, 2007). Em um modelo utilizando camundongos deficientes em INF- $\gamma$  em uma infecção experimental por *T. gondii*, as populações B-2 das LB exibiram funções imunomodulatórias, aumentando a secreção de IL-4 e IL-10 e fazendo uma *downregulation* do ON liberados pelos macrófagos da cavidade peritoneal (MUN et al., 2003). Em outro modelo experimental para inflamação de epitélio intestinal, camundongos

infectados oralmente com oocistos apresentaram diferentes papéis para as LB na regulação ou indução da inflamação. A interpretação destes resultados foi baseada no fato de que, em camundongos com depleção de células B infectados com o *T. gondii*, tiveram um aumento na produção de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  pelas células T CD4+ e CD8+, bem como da IL-12 pelas CD. Esse efeito foi suspenso quando células B foram transferidas aos roedores, causando um efeito de modulação negativa. Essas observações apresentadas acima foram descritas por WEISS & KIM (2007), levaram estes autores a especular que as LB atuam principalmente como células imunomoduladoras com efeito anti-inflamatório.

De maneira geral, durante ambas as fases, aguda e crônica, da toxoplasmose, a imunidade protectora se baseia primariamente na secreção de INF- $\gamma$  pelas NK, NKT e células T. Desta maneira o aumento da sobrevivência do *T. gondii* é facilitado por situações de imunodeficiências (de forma geral), combinadas com a deficiência específica de INF- $\gamma$  (SHER et al., 2003). Essa resposta (ou ausência dela), por sua vez, parece estar diretamente ligada a produção de IL-12 pelas CD, pois a IL-12 interleucina promove a síntese de INF- $\gamma$  pelas NK (WEISS & KIM, 2007). Ainda, é assumido que a IL-12 serve como uma “ponte” entre a imunidade inata e adaptativa, pela promoção do desenvolvimento de células efetoras do tipo Th1, assim garantindo um controle da infecção por um período mais longo (SHER et al., 2003).

#### 2.1.6 Patogenia e fisiopatologia

No homem, o período de incubação varia de 10 a 23 dias após a ingestão de carne mal cozida, e de 5 a 20 dias após ingestão de oocistos (JONES et al., 2001). O parasito pode causar uma grande destruição de células devido à sua própria ação, hiperestimulação imuno-inflamatória, ou pela hipersensibilidade apresentada pelo hospedeiro. As manifestações da doença no homem estão, geralmente, relacionadas a uma vulnerabilidade tissular, especialmente associada à regeneração lenta ou ausente. A infecção materna, embora inaparente pode determinar lesões destrutivas no feto (FRENKEL, 2002).

Em indivíduos imunossuprimidos, inclusive pacientes infectados pelo HIV, pacientes com doenças linfoproliferativas, em quimioterapia, ou que receberam transplante de órgãos, os bradizoítos podem ser liberados dos cistos teciduais, transformarem-se em taquizoítos,

levando à reagudização da infecção toxoplásmica (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). A encefalite, em pacientes imunossuprimidos, é a manifestação mais grave da toxoplasmose devido à reativação de cistos cerebrais (HILL & DUBEY, 2002).

Uma vez penetrando em células da circulação tais como macrófagos (DA GAMA et al., 2004; COURRET et al., 2006) e células dendríticas (COURRET et al., 2006; LAMBERT et al., 2006), o parasito consegue utilizar essas células como “cavalos de Tróia”, conseguindo, na maioria das vezes, estabelecer “sítios de privilégio” em órgãos, como por exemplo, o cérebro (CARRUTHERS & SUZUKI, 2007). Estudos *in vitro* utilizando células cerebrais de camundongos demonstraram que os taquizoítos invadem a micróglia (CHAO et al., 1993; FISCHER et al., 1997), astrócitos (JONES et al., 1986; HALONEN et al., 1998) e neurônios, posteriormente formando cistos teciduais nestas células (JONES et al., 1986; FISCHER et al., 1997). Estudos envolvendo microscopia eletrônica em cérebro de camundongos cronicamente infectados demonstraram que a maioria dos cistos teciduais estavam localizados nos neurônios (FERGUSON & HUTCHISON, 1987a, 1987b), interior dos axônios, dos dendritos e do corpo celular neuronal (FERGUSON & HUTCHISON, 1987b). Além disso, em camundongos com toxoplasmose congênita, cistos teciduais foram observados no interior de neurônios (SIMS et al., 1989).

Os efeitos dos taquizoítos nas células cerebrais são quase que imediatos como demonstrado pelo estudo de BLADER et al. (2001), os quais utilizaram taquizoítos (cepa tipo II) para avaliar a expressão gênica desses taquizoítos em fibroblastos humanos. Dentro das primeiras 2 horas de infecção, mais da metade dos genes afetados codificaram proteínas associadas à resposta imune. Taquizoítos intracelulares são também capazes de manipular e subverter uma variedade de ações, tais como a apoptose (MOLESTINA & SINAI, 2005; CARMEN et al., 2006; KIM & DENKERS, 2006), mecanismos efetores microbianos (LIEBERMAN et al., 2004; MASON et al., 2004; KIM et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2006) e maturação das células do sistema imune (McKEE et al., 2004).

Coletivamente, estes estudos, demonstram a que *T. gondii* pode infectar uma variedade de células, destacando aqui as do SNC, bem como causar inúmeras alterações que geralmente levam à subversão das defesas do hospedeiro em detrimento a sua melhor adaptação e sobrevivência. Dessa forma, a avaliação de alguns parâmetros que possam participar influenciando a resposta imune, bem como a neuromodulação são extremamente indicados, visto a capacidade de proliferação do parasito em condições de imunossupressão e as neuropatologias relatadas e relacionadas à doença. Nesse sentido, os dois próximos subtítulos

da revisão de literatura irão tratar da participação e importância dos sistemas purinérgico e colinérgico em relação a aspectos imunológicos e neuromodulatórios.

## 2.2 O Sistema purinérgico

A sinalização purinérgica (Figura 6A) é uma importante via moduladora de variados processos fisiológicos, envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo secreção exócrina e endócrina, respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2006). Três componentes principais fazem parte do sistema purinérgico: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, seus receptores e as ectoenzimas responsáveis pela regulação dos níveis dessas moléculas (YEGUTKIN, 2008).

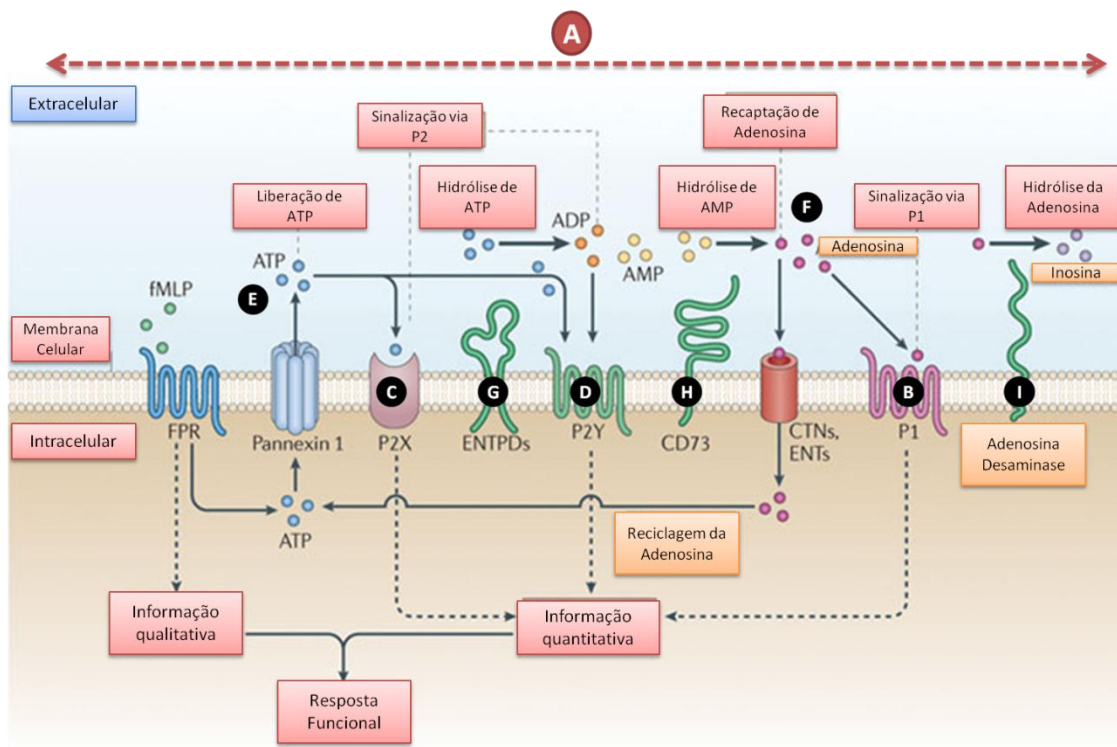


Figura 6. Componentes da sinalização purinérgica (A); receptor do tipo P1 (B); Receptor do tipo P2X (C); Receptor do tipo P2Y (D); ATP liberado extracelularmente (E); Adenosina formada a partir do ATP via CD39 e CD 73 (F); E-NTPDase (ou CD39) (G); 5' nucleotidase (ou CD 73) (H); e E-ADA (I). Adaptada de JUNGER (2011).

## 2.2.1 Receptores P1 e P2

### 2.2.1.1 Receptores P1 (RP1)

RP1 são receptores metabotrópicos (Figura 6B) cujo agonista endógeno é a adenosina. Quatro diferentes subtipos de RP1 foram clonados e caracterizados: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, todos membros da superfamília de receptores ligados à proteína G. Como todos os representantes desta superfamília, esses receptores apresentam 7 segmentos transmembrana (TMs), com o terminal *amino* voltado intracelularmente, e o terminal *carboxil* intracelularmente. Os receptores P1 humanos apresentam de 39 a 61% de identidade entre si, e apenas de 11 a 18% de identidade com os receptores P2Y (BURNSTOCK, 2007). Os receptores para adenosina P1 estão presentes em várias espécies animais e em vários tecidos. No entanto, a distribuição destes receptores é bastante irregular entre as espécies e principalmente entre os tecidos (FREDHOLM et al., 2011).

O receptor A<sub>1</sub> é um receptor ubíquo, sendo que, no sistema nervoso central está distribuído no cerebelo, córtex cerebral, hipocampo, tálamo, medula espinhal (substância gelatinosa), tronco encefálico, bulbo olfatório e outras regiões. Periféricamente, a distribuição dos A<sub>1</sub> é menos abundante que centralmente. Contudo, há uma considerável densidade de A<sub>1</sub> em fibras aferentes sensoriais primárias, principalmente em fibras C, as principais em detectar o estímulo nociceptivo (DIXON et al., 1996; CARRUTHERS et al., 2001; SAWYNOK & LIU, 2003; SCHULTE & FREDHOLM, 2003).

O receptor A<sub>2A</sub> de adenosina também é encontrado no sistema nervoso periférico e central, mas, sobretudo, no núcleo acumbens, putamen, timo, músculo liso vascular, endotélio, plaquetas e neurônios sensoriais primários (DIXON et al., 1996; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; CARRUTHERS et al., 2001). O A<sub>2B</sub> é encontrado também no sistema nervoso periférico e central. Entretanto, a densidade deste receptor é muito baixa e ele é expresso consideravelmente apenas no intestino e na bexiga. Os A<sub>3R</sub> são amplamente distribuídos em diversos mamíferos, porém, até o momento poucos estudos atribuem funções fisiológicas para este receptor (SALVATORE et al., 1993; DIXON et al., 1996; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

### 2.2.1.2 Receptores P2 (RP2)

Ao contrário dos receptores da adenosina, os receptores P2 são divididos em dois grupos bem distintos: em ionotrópicos ou P2X (Figura 6C), e em metabotrópicos, ou P2Y (Figura 6D) (DUBYAK, 1991; FREDHOLM et al., 1997; BOARDER & HOURANI, 1998; BOEYNAEMS et al., 2000). As subunidades que formam os receptores P2X apresentam duas alfas-hélices transmembrana (TMI e TMII) unidas por uma longa alça extracelular. Os terminais *amino* e *carboxil* estão voltados intracelularmente. Sete subunidades foram clonadas e sequenciadas (P2X<sub>1-7</sub>), apresentando de 30 a 50% de identidade entre elas (BURNSTOCK, 2007; GEVER et al., 2006). A maioria dos receptores P2X está distribuída distintamente nos neurônios centrais e periféricos (BURNSTOCK, 2001). O ATP é o principal agonista, sendo que os outros nucleotídeos (ADP, UTP, UDP) não possuem afinidade ou possuem uma afinidade muito reduzida pelos receptores P2X (IDELSON, 2001). No espaço intracelular o ATP estimula os receptores P2X, causando despolarização celular, abertura do poro do canal e fluxo iônico, com conseqüente acúmulo intracelular de Ca<sup>2+</sup>, e assim, a iniciação das funções celulares. O aumento dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> evoca uma liberação de transmissores de células gliais e neuronais do sistema nervoso central e periférico, promove liberação de hormônios de glândulas endócrinas, disparos na contração muscular, regula motilidade ciliar de vias aéreas e ativa cascatas de sinalização em uma variedade de células (NORTH, 2002).

Os receptores metabotrópicos P2Y são receptores purínicos e pirimidínicos que se caracterizam por estarem acoplados à proteína G (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2001). Eles têm sete domínios transmembrana, um *N-terminal* extracelular e um *C-terminal* intracelular. Vários receptores P2Y foram clonados, incluindo os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e o receptor P2Y<sub>14</sub>. Os receptores P2Y expressos têm sido distinguidos farmacologicamente pela ordem de efetividade dos agonistas, alguns preferindo pirimidinas a purinas (BURNSTOCK, 2001). Receptores P2Y apresentam um baixo nível de identidade entre si (19-55%) (BURNSTOCK, 2007).

Os receptores P2Y podem ser divididos em dois grupos de acordo com a proteína G à qual estão acoplados. Os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub> são acoplados a proteínas *Gaq* e os receptores P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub> são acoplados a proteínas *Gai* (ABBRACCHIO et al., 2006). Assim, em resposta à ligação do nucleotídeo, os receptores P2Y tanto podem ativar a via PLC/IP3 através da *Gaq* para liberar Ca<sup>2+</sup> intracelular e ativar a

PKC, ou podem inibir a adenilil ciclase para reduzir os níveis de AMPc através da *Gai* (ABBRACCHIO et al., 2006).

### 2.2.2 Funções dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

Os nucleotídeos extracelulares, ATP, ADP e AMP, bem como a adenosina, têm sido implicados em um grande número de funções fisiológicas (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Apesar de funções extracelulares para purinas terem sido descritas logo após a descoberta do ATP e ADP, o interesse sobre estas molécula tinha somente como base o conceito de "ligação fosfato de alta energia" (VASSORT, 2001). Atualmente está bem estabelecido o conceito de que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares, capazes de sinalizar uma variedade de efeitos biológicos no meio extracelular (BURNSTOCK, 2006).

#### 2.2.2.1 O ATP

O ATP é conhecido como um sinal de dano, ou padrão molecular associado ao dano (DI VIRGILIO, 2005). Uma vez liberado (Figura 6E), o ATP contribui para o desencadeamento da resposta inflamatória juntamente com os padrões moleculares associados a patógenos (MARIATHASAN & MONACK, 2007). Esses sinais de dano parecem ser importantes para promover a regulação da inflamação após o trauma ou danos associadas a patógenos. A liberação de ATP nos terminais pré e pós-sinápticos pode ocorrer como um mecanismo fisiológico, ou em resposta a danos celulares, como a hipóxia e injúrias (BURNSTOCK, 2006). Este nucleotídeo também pode ser armazenado em vesículas sinápticas, sendo liberado por exocitose como um co-transmissor, juntamente com neurotransmissores como a acetilcolina (ACh) e o glutamato (ZIMMERMANN, 1996). Além disso, o ATP pode ser liberado por exocitose nas células neuronais e nas células não neuronais através de transportadores que se ligam a esse nucleotídeo ou via canais acoplados à conexina ou panexina (SABIROV & OKADA, 2005). A liberação de ATP também pode ocorrer durante a resposta imune ou por células do endotélio danificadas, já que linfócitos T e

eritrócitos secretam ATP por canais de panexina-1. Estes canais são responsáveis pela liberação de ATP, que atua como sinais “*find me*”, controlando a permeabilidade da membrana durante os mecanismos de apoptose (LOCOVEI et al., 2006).

O ATP, dependendo da sua concentração e local de ação, possui ações pró e anti-inflamatórias, dependendo da sua concentração extracelular e tipo de receptor envolvido (DI VIRGILIO, 2005; BOEYNAEMS & COMMUNI, 2006; DI VIRGILIO et al., 2009). Em situações pró-inflamatórias, ocorre a estimulação e proliferação de linfócitos, sendo necessário para a secreção de importantes citocinas dependentes das células T, como INF- $\gamma$  e IL-2, intimamente envolvidas na indução de resposta imune a antígenos estranhos. Também apresentam outros efeitos em muitos processos biológicos, como contração do músculo liso, neurotransmissão, inflamação e dor (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; SITKOVSKY, 1998; SNEDDON et al., 1999). Além disso, o ATP está envolvido no recrutamento de monócitos para tecidos alvo (VENTURA & THOMOPOULOS, 1995), na produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por macrófagos (ELSSNER et al., 2004; GUERRA et al., 2003) e na migração e diferenciação de células dendríticas (LA SALA et al., 2003). Porém, contraditoriamente, o ATP extracelular também pode desempenhar um papel imunossupressor, por inibir a proliferação de células T e, conseqüentemente, bloqueando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (DEAGLIO et al., 2007; GESSI et al., 2007). Esse mecanismo se dá principalmente quando o ATP está em baixas concentrações extracelulares, aumentando a sua afinidade por receptores do tipo P2Y, localizados na superfície dos linfócitos. Estes receptores quando estimulados promovem uma *downregulation* na expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, estimulam uma resposta Th2, e levam a liberação de citocinas anti-inflamatórias, promovendo um efeito protetor contra danos teciduais excessivos (BOURS et al., 2006).

Dessa forma, esses danos geralmente ocorrem justamente em casos em que o ATP extracelular é encontrado em elevadas concentrações, podendo assim, atuar como uma potente molécula citotóxica, capaz de levar à morte diferentes classes de células pela formação de grandes poros na membrana plasmática (FILIPPINI et al., 1990).



### 2.2.2.2 Adenosina (ADO)

Tratando-se da ADO (Figura 6F), esta é um importante componente do sistema purinérgico, agindo como um modulador do SNC, regulando o metabolismo das células e participando de uma série de efeitos fisiológicos, tais como a apoptose, necrose e proliferação celular. Este nucleosídeo também é considerado uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações antagônicas as do ATP (BOURS et al., 2006), pois medeia ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, tais como a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e da proliferação de linfócitos (GESSI et al., 2007). Em condições patológicas, a adenosina desempenha um papel protetor, modulando a liberação de neurotransmissores, também atua como um regulador endógeno da imunidade inata e na defesa do hospedeiro de lesão tecidual excessiva associada à inflamação (RATHBONE et al., 1999; BERAUDI et al., 2003; HASKO & CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY & OHTA, 2005; BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007).

Embora a ADO esteja continuamente presente no espaço extracelular em baixas concentrações, condições de estresse metabólico aumentam dramaticamente os seus níveis extracelulares (OLAH & STILES, 1995; BARALDI & BOREA, 2000). As ações fisiológicas da ADO resultam quase que exclusivamente da ocupação dos receptores de superfície e pela ativação de vias de sinalização intracelular (HASKÓ & CRONSTEIN, 2004). Os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  são ativados por concentrações de adenosina na faixa de nanomolar, já os subtipos  $A_{2B}$  e  $A_3$  tornam-se ativos somente quando os níveis extracelulares de adenosina se elevam na faixa de micromolar durante períodos de inflamação, hipóxia ou isquemia (OLAH & STILES, 1995; BARALDI & BOREA, 2000).

### 2.2.3 Ectonucleotidases e Adenosina Desaminase

As concentrações dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, em muitos tecidos, são reguladas pela ação de enzimas ancoradas à membrana celular, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Essas enzimas hidrolisam os nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos, e dentre elas estão as E-NTPDases (ecto-difosfohidrolases, CD39 ou apirases) (Figura 6G), que hidrolisam tanto ATP quanto ADP a AMP, na presença

de cátions divalentes como cálcio e magnésio, e a E-5'-nucleotidase (CD73) (Figura 6H) termina a cascata ectonucleotidásica com a hidrólise dos nucleotídeos monofosfatados, resultando em adenosina. Esta por sua vez é hidrolisada pela enzima adenosina deaminase (E-ADA), transformando a adenosina em inosina, seu metabólito inativo (ZIMMERMANN, 1996).

### 2.2.3.1 Ectonucleotidasas

As ectonucleotidasas estão ancoradas na membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular, ou estão presentes na forma solúvel no meio intersticial (ZIMMERMANN, 2011). Este grupo de enzimas é constituído pelas famílias das ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-5'-nucleotidase e fosfatases alcalinas.

A E-NTPDase desempenha importante controle da função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990), e a capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KACZMAREK et al., 1996). A enzima E-5'-nucleotidase também desempenha funções não enzimáticas, como a indução da sinalização intracelular e mediação de processos de adesão célula-célula e célula-matriz e de migração (VOGEL et al., 1991). Diversos estudos têm demonstrado a importância das enzimas E-NTPDase e E-5'-nucleotidase no processo de neurotransmissão em diferentes patologias. O aumento na atividade dessas enzimas pode surgir como um mecanismo adaptativo com a finalidade de reduzir os níveis de ATP e aumentar os níveis de adenosina no meio, conferindo neuroproteção (LUNKES et al., 2004; SPANEVELLO et al., 2006; KAIZER et al., 2007).

Os membros da família das E-NTPDases são codificados por oito genes diferentes. Quatro membros desta família de enzimas estão localizados na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular, sendo eles E-NTPDases 1, 2, 3 e 8. A E-NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, enquanto a E-NTPDase3 e a E-NTPDase8 apresentam preferência por ATP em relação ao ADP como substrato. A E-NTPDase2 se caracteriza por possuir uma alta preferência por nucleosídeos trifosfatados e foi previamente classificada como uma ecto-ATPase (KACZMAREK et al., 1996; CHADWICK & FRISCHAUF, 1997; SMITH & KIRLEY, 1998; SÉVIGNY et al., 2000; ROBSON et al., 2006). Outros dois membros

conhecidos como E-NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular, porém, são secretadas após expressão heteróloga (MULERO et al., 1999; BRAUN et al., 2000). As E-NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com o sítio ativo voltado para o lúmen de organelas citoplasmáticas (WANG & GUIDOTTI, 1998; BIEDERBICK et al., 2000; SHI et al., 2001). Estas enzimas hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (BIGONNESSE et al. 2004; ROBSON et al., 2006; ROSEMBERG et al., 2010).

### 2.2.3.2 E-ADA

A concentração de ADO no meio extracelular é determinante para os efeitos de neuromodulação dessa molécula (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). A Adenosina desaminase (E-ADA, EC 3.5.4.4) (Figura 6I) é responsável pela desaminação hidrolítica da adenosina em inosina, seu metabólito inativo. A E-ADA é amplamente distribuída nos tecidos dos animais vertebrados e divide-se em duas isoformas: E-ADA<sub>1</sub> e E-ADA<sub>2</sub>. Tecidos contêm predominantemente E-ADA<sub>1</sub>, enquanto a E-ADA<sub>2</sub> é o principal componente do soro e, constituindo-se como um estimulador de linfócitos T (FRANCO et al., 1997; BURNSTOCK, 2006).

A E-ADA foi detectada na superfície de muitos tipos celulares, incluindo sinaptossomas cerebrais. A expressão da atividade desta enzima é heterogênea em tecidos periféricos e no SNC. A atividade da E-ADA apresenta grande variação em áreas cerebrais de acordo com as vias purinérgicas (GEIGER & NAGY, 1986; FRANCO et al., 1986; 1997). Apesar da E-ADA estar presente em todos os tipos de células, sua atividade é mais alta no timo, tecidos linfóides e em linfócitos periféricos. Tem sido demonstrado que esta enzima desempenha um papel importante na função dos linfócitos e é essencial para o crescimento normal, diferenciação e proliferação de linfócitos (FRANCO et al., 1997; CODERO et al., 2001). A deficiência de E-ADA acarreta um aumento dos níveis de adenosina extracelular, o que pode contribuir para condições patológicas (ALDRICH et al., 2000).

## 2.3 O Sistema colinérgico

O sistema colinérgico tem um papel fundamental em várias funções vitais, como o aprendizado, a memória e a organização cortical do movimento (MESULAM et al., 2002). No sistema nervoso autônomo, o sistema colinérgico controla a frequência cardíaca (MENDELOWITZ, 1999) e a contração da musculatura lisa gástrica (ROGERS et al., 1999). No SNC, o sistema colinérgico está envolvido em funções cognitivas, como atenção e memória (GOLD, 2003). O conhecimento desse sistema, principalmente das vias de sinalização intracelular e intercelular, que se iniciam pela ativação dos receptores colinérgicos, tem sido utilizado no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para algumas doenças.

A mecânica de funcionamento, do sistema colinérgico se dá por uma estreita relação entre a sua principal molécula, a acetilcolina (ACh), com as colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Estas enzimas fazem a regulação das concentrações da ACh, e esta ação pode levar a diferentes situações fisiológicas, dentre as quais a modulação de processos inflamatórios (DAS, 2007).

### 2.3.1 A Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos SNC e sistema nervoso periférico (SNP). Essa é sintetizada no citosol dos neurônios a partir da acetil coenzima-A (acetil-CoA) e da colina. A acetil-CoA tem origem mitocondrial, ao passo que a colina provém da fenda sináptica, extracelular. A colina atravessa a membrana do terminal axônico por um mecanismo de transporte ativo específico (SILVA, 1998). A combinação da acetil-CoA à colina é catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT) (Figura 7A). Depois de sintetizada, a ACh é armazenada nas vesículas sinápticas (Figura 7B). Este neurotransmissor possui um papel crucial no SNC e tem sido associado com as funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (SCREMIN et al., 1997). No terminal axonal, as vesículas pré-sinápticas contendo ACh ficam armazenadas até que haja um estímulo que as libere (KUTTY, 1980; SILVA, 1998).

O impulso nervoso, ou potencial de ação, ao chegar ao botão sináptico, onde estão as vesículas sinápticas, ocasiona uma despolarização da membrana pré-sináptica, aumentando a

condutância do cálcio, o que favorece a sua entrada no axônio. Desta maneira, a liberação da ACh varia diretamente com a concentração de cálcio (PRADO et al., 2002). Posteriormente, ocorre o “rompimento das vesículas” e o extravasamento do neurotransmissor na fenda sináptica, ocorrendo a fusão com a membrana. A ACh liberada (Figura 7C) pode se difundir no espaço extracelular, ser degradada a colina e ácido acético pela acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (Figura 7D), ou ainda, combinar-se com receptores colinérgicos pós e pré-sinápticos.

Os receptores colinérgicos (Figura 7E) são classificados em nicotínicos e muscarínicos (nAChR e mAChR), os quais transmitem os sinais por diferentes mecanismos. Os nAChR e mAChR cerebrais atuam a nível pré-sináptico. Porém os nAChR estão distribuídos de modo mais esparsos e facilitam a liberação de outros neurotransmissores como a dopamina (RANG et al., 2004). Esses receptores são formados por diversas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\alpha 2 - \alpha 10$ ,  $\beta 2 - \beta 4$ ). As diferentes associações dessas subunidades conferem propriedades estruturais e funcionais distintas aos diferentes subtipos de nAChR (DAJAS-BAILADOR & WONNACOTT, 2004).

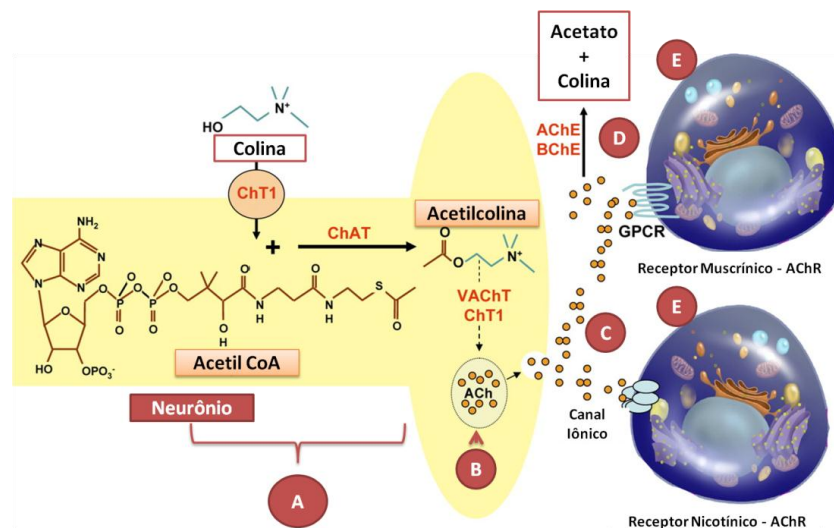


Figura 7. Acetilcolina: Produção, liberação, degradação e interação com receptores colinérgicos. Adaptada de SHAH et al., (2008).

### 2.3.2 As colinesterases

As colinesterases são enzimas presentes em tecidos colinérgicos, e não colinérgicos, assim como no sangue e outros fluídos corporais. São divididas em duas classes, de acordo

com suas propriedades catalíticas, especificidade aos substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989). A acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) hidrolisa, preferencialmente, ésteres com grupamento acetil, e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina (TAYLOR & BROWN, 1999).

A AChE possui um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica. Ela é responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor ACh. É encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas, e em concentrações elevadas, na junção neuromuscular (MASSOULIÉ et al., 1993). A AChE está amplamente distribuída no SNC e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (SILVA, 1998). A enzima circulante pode ter papel não-catalítico como sugerido que variantes estruturais da AChE estão amplamente distribuídas pelos tecidos. Tem-se correlacionado sua participação no crescimento e adesão celular (DARBOUX et al., 1996), neurogênese (LAYER, 1990), sinaptogênese (LAYER, 1991) e hematopoiese (LEV-LEHMAN et al., 1994).

A BChE é uma enzima sérica produzida no fígado (TAYLOR & BROWN, 1999). Sua variabilidade é conhecida desde a década de 50, devido a sua capacidade de hidrolisar diversos ésteres de colina (KALOW & STARON, 1957). A estrutura da enzima BChE é codificada pelo gene BCHE que está localizado no braço longo do cromossomo 3. Essa enzima, no soro ou plasma, após eletroforese, pode aparecer sob cinco formas moleculares classificadas em ordem de peso molecular (HARRIS et al., 1963; ARPAGAUSS et al., 1990). Embora a BChE possa ser encontrada nos principais sistemas corpóreos dos mamíferos, como massa branca do cérebro, sistema vascular, respiratório, digestório, urogenital e também em certas glândulas endócrinas e exócrinas, sua função biológica ainda não é claramente estabelecida, havendo sugestões de que esteja relacionada com o metabolismo de lipídeos, condução nervosa lenta e regulação dos níveis de colina e acetilcolina do plasma (KUTTY, 1980; WHITTAKER, 1980). Não há substrato natural específico para BChE, embora essa seja capaz de hidrolisar a ACh (MASSOULIÉ et al., 1993), sugerindo-se que a BChE seja uma enzima de varredura natural, responsável pela detoxificação de compostos naturais. A BChE é responsável pela hidrólise de ésteres da colina hidrofílicos e hidrofóbicos. Dentre os compostos naturais hidrolisados pela BChE, inclui-se ésteres como a cocaína. Além disso, essa enzima apresenta relevante papel no metabolismo de lipoproteínas e hidrólise de outros ésteres provenientes da dieta (O'NEILL & DOUKAS, 1998).

### 2.3.3 A via colinérgica anti-inflamatória

Há alguns anos, uma nova propriedade foi identificada para a AChE e BChE: a atuação dessas enzimas como marcadores inflamatórios (DAS, 2007). A atividade dessas enzimas no plasma e nos tecidos é elevada em pacientes com doença de Alzheimer (PERRY et al., 1978; GEULA & MESULAM, 1995; GIACOBINI, 2003) and diabetes mellitus (ABBOTT et al., 1993; SRIDHAR et al., 2005) e, como resultado deste aumento, o nível de ACh no plasma e tecidos é reduzido. A via colinérgica anti-inflamatória (Figura 8) é mediada pela ACh, cuja atuação se dá por uma inibição a produção de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF). A ACh regula os níveis da serotonina, dopamina e de outros neuropeptídeos e, portanto, modula tanto a resposta imune como a neurotransmissão (RAMIREZ et al., 1997). A ativação de fibras do nervo vago aferente, por endotoxinas ou citocinas pró-inflamatórias, estimula a resposta anti-inflamatória hipotalâmica-pituitária-adrenal que conduzem os sinalizadores através do nervo vago eferente (DAS, 2007). Essa via tem sido chamada de via colinérgica anti-inflamatória, pois a ACh é o principal neurotransmissor envolvido, sendo considerado uma molécula anti-inflamatória, afinal, macrófagos expostos a esse neurotransmissor são eficientemente inibidos em secretar  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , proteína do tipo *high mobility group box 1* (HMGB1) e uma série de outros mediadores inflamatórios (TRACEY, 2002; 2009).

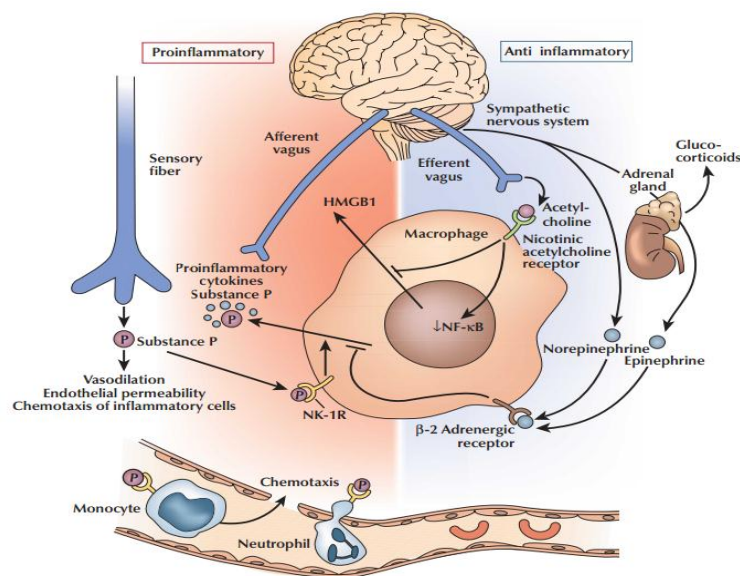


Figura 8. Modulação neuronal da inflamação. Fonte: MATTHAY & WARE (2004).

A inflamação periférica é detectada pelo SNC por meio de dois importantes mecanismos de comunicação: rota humoral e rota neural. Na rota humoral, o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são ativamente transportados através da barreira hematoencefálica (BHE), enquanto a IL-1 $\alpha$  penetra diretamente no cérebro através dos órgãos circunventriculares onde a BHE é inexistente ou descontínua, induzindo cicloxigenase-2 (COX-2) que processa ácido araquidônico e libera prostaglandina E2 (PGE2). Receptores de PGE, localizam-se em áreas cerebrais que possuem importantes funções na resposta inflamatória periférica como ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e o desenvolvimento de febre e anorexia (TRACEY, 2002; CZURA & TRACEY, 2005). As estruturas do complexo dorsal do nervo vago respondem ao aumento de TNF $\alpha$  circulante, alterando a atividade do nervo (TRACEY 2002; TRACEY 2009), sendo esse o meio predominante para a comunicação do sistema imune com o SNC, quando os níveis de citocinas estão bem elevados (CZURA & TRACEY, 2005).

A rota neural da inflamação funciona em baixos níveis de detecção, ativando respostas mesmo quando os agentes inflamatórios estão presentes nos tecidos em níveis não suficientes para alcançar o cérebro pela circulação sanguínea, pois o SNC é capaz de ser informado sobre o estado da inflamação via sinais neurais aferentes (TRACEY, 2002; 2007; 2009). Os mecanismos de detecção de mediadores inflamatórios ainda não estão completamente elucidados, mas neurônios do nervo vago expressam tanto o mRNA quanto o receptor de IL-1 $\alpha$  (GOEHLER et al., 2000; CZURA & TRACEY, 2005). Estudos eletrofisiológicos indicaram que o nervo vago também pode ser ativado por TNF- $\alpha$  e outras citocinas, mecanorreceptores, quimiorreceptores, sensores de temperatura e osmolaridade, os quais podem ser ativados no sítio da inflamação (BERTHOUD & NEUHUBER, 2000; TRACEY, 2002; CZURA & TRACEY, 2005). O controle neural de produção e secreção de citocinas provê uma importante alternativa para a regulação humoral por ser rápido, integrado, e não dependente de gradientes de concentração (CZURA & TRACEY, 2005).

Em relação aos linfócitos, sabe-se que estas células possuem todos os componentes necessários para constituírem um sistema colinérgico extraneuronal independente (KAWASHIMA & FUJII, 2000). A ACh, pela ligação aos nAChR e mAChR dos linfócitos, promove um aumento no conteúdo de GMPcíclico e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) no interior dessas células, incrementando sua citotoxicidade. Além disso, ocorre modulação da síntese de DNA e proliferação celular. A ACh liberada pelos linfócitos é capaz de induzir influxo de cálcio extracelular e liberação de cálcio intracelular no citoplasma, pelo aumento do inositol, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. O cálcio também vai estimular o aumento da ChAT, aumentando a produção e liberação de ACh pelos linfócitos. Assim, o sistema



colinérgico linfocitário também está envolvido na regulação da função imune (KAWASHIMA & FUJII, 2003).

Sabendo-se da importância da toxoplasmose na saúde pública e na produção animal, bem como o fato de que os sistemas colinérgico e purinérgico desempenham papéis importantes na regulação da resposta imune, os objetivos dos trabalhos realizados foram: avaliar a correlação da doença com ambos os sistemas a nível periférico (a) e em *in loco* (b). Desta forma, os resultados, discussões e conclusões obtidos em cada um dos desenhos experimentais estão apresentados na forma de artigos que compõem os capítulos I, II e III dessa tese.



## 3 CAPÍTULO I

### 3.1 Artigo 1

**E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii***

Alexandre A. Tonin, Aleksandro S. Da Silva, Jader B. Ruchel, João F. P. Rezer, Giovana Camillo, Luciana Faccio, Raqueli T. França, Daniela B.R. Leal, Marta M.M.F. Duarte, Fernada F. Vogel, Mario L. de la Rue, Sonia T.A. Lopes

Artigo publicado em: *Experimental Parasitology*, 135 (2013) 325–330.

DOI: /10.1016/j.exppara.2013.07.014

Anexo I

**E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response  
of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii***

Alexandre A. Tonin<sup>a\*</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>b</sup>, Jader B. Ruchel<sup>c</sup>, João F. P. Rezer<sup>c</sup>, Giovana Camillo<sup>d</sup>, Luciana Faccio<sup>c</sup>, Raqueli T. França<sup>a</sup>, Daniela B.R. Leal<sup>c</sup>, Marta M.M.F. Duarte<sup>e</sup>,  
Fernada F. Vogel<sup>d</sup>, Mario L. de la Rue<sup>c</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Small Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>d</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Luteranda do Brasil - ULBRA. Santa Maria, Brazil.

\*Corresponding author. Departamento de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi – 9, Veterinarian Hospital, Room 103. CEP 97105900. Santa Maria – RS, Brazil Tel.: + 55 55 32208814. E-mail [tonin\\_alexandre@yahoo.com.br](mailto:tonin_alexandre@yahoo.com.br)

**E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response  
of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii***

**Abstract**

An investigation of E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes from rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii* was carried out in this study. For this purpose, twenty four adult male Wistar rats were divided in two groups/four subgroups (A1 and A2; B1 and B2 - 6 animal/each group), with “A” as uninfected and “B” inoculated with *T. gondii* (RH strain). Sampling was performed on days 5 and 10 post-infection (p.i.), with evaluation of hemogram, immunoglobulins (IgM and IgG) and activity of E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes. Enzymes essays showed ATP hydrolysis increased on days 5 ( $P<0.05$ ) and 10 ( $P<0.01$ ) p.i., as well as an increase of ADP hydrolysis on day 10 ( $P<0.01$ ) p.i.. E-ADA activity on lymphocytes was also increased in both evaluated periods ( $P<0.01$ ). Based on E-NTPDase and E-ADA increased activities observed on lymphocytes, it is possible to suggest their involvement in an anti-inflammatory response, consisting of a modulatory response, preventing excessive tissue damage caused by the infection with *Toxoplasma gondii*.

**Keywords:** lymphocytes; enzymes; E-NTPDase; E-ADA; toxoplasmosis.

## 1. Introduction

Toxoplasmosis, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, is a worldwide zoonosis with very high seroprevalence in South America. Toxoplasmosis is usually asymptomatic in immunocompetent adults, but can cause mortality in the very young and the immunocompromised (Dubey, 2012). Humans and other animals become infected with *T. gondii* mostly by ingesting undercooked meat of infected animals or by ingesting food or water contaminated with oocysts (Dubey, 2012). The success of *T. gondii* is a delicate balance between the host immune response, which tries to clear the parasite, and the immune evasion strategies or immunomodulation elicited by the parasite, which enables the ultimate survival of both the parasite and the host (Miller et al., 2009). A tip of the balance in either direction is deleterious, as exemplified in AIDS patients, whereby the loss or decrease of a functioning immune system results in the uncontrolled replication of recrudescing parasites and the death of the host due to toxoplasmic encephalitis if not treated appropriately (Miller et al., 2009).

The purinergic signaling system plays an important role in modulating the inflammatory and immune responses by extracellular biomolecules such as adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their derived nucleoside adenosine (Ralevic and Burnstock, 2003). Evidence indicates that extracellular ATP acts through specific cell surface receptors as a pro-inflammatory agent that potentiates the release of pro-inflammatory cytokines (Bours et al., 2006) from activated lymphocytes (Langston et al., 2003). However, extracellular ATP also plays an additional role as a negative modulator of immunity (Di Virgilio et al., 2009). Its breakdown product, adenosine, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting proliferation of T cells and secretion of cytokines (Deaglio et al., 2007; Gessi et al., 2007). Extracellular ATP and adenosine are controlled by ecto-enzymes such as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; CD39;

EC 3.6.1.5) and ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), which are anchored in the cellular surface with their active site facing the extracellular environment (Zimmermann, 2001).

Considering the purinergic system enzymes as closely involved in the modulation of immune system, participating in the regulation of pro and anti-inflammatory events, this study aimed to investigate the E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes from rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Experimental Animals**

Twenty four adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), average 60 days old and 200 g in weight, purchased from the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Breeder were used. The animals were kept in an experimental room with controlled temperature and humidity (25°C; 70% RH). They were fed a commercial ration, with water *ad libitum*, and submitted to a period of 7 days of adaptation.

The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), number 003/2011.

### **2.2. *Toxoplasma gondii* strain and inoculum preparation**

For this experiment, it was utilized a strain of *T. gondii* (RH, isolated by Sabin, 1941) kept in liquid nitrogen in laboratory. Firstly, one mouse was inoculated with tachyzoites of *T. gondii*. Four days later, peritoneal fluid containing the parasite was collected and inoculated into other mice. This procedure was repeated three times, in order to reactivate the parasite virulence and for obtaining a large number of *T. gondii* tachyzoites.

### **2.3. Experimental design and sample collection**

The twenty four animals were divided in two groups (A and B - 12 animals/each group), and from these again divided in four sub groups (A1, A2, B1 and B2 - 6 animal/each group). Groups A and B served as uninfected and infected, respectively. A volume of 0.5 ml of peritoneal fluid containing  $1.2 \times 10^7$  tachyzoites was inoculated in group B (12 rats Wistar), intraperitoneally. The volume of 0.5 ml saline was administered in group A, by the same method.

On day 5 post infection (p.i.) (subgroup A1 and B1) and day 10 PI (subgroup A2 and B2) the sample collections were performed. The animals were anesthetized in chamber with isoflurane for collection of blood by cardiac puncture (8mL). The storage of the samples was considered accordingly to the analysis. Thus, part of the material collected was allocated in tubes containing anticoagulant (EDTA 10%) for separation of lymphocytes, analysis of hemogram, immunoglobulins and activity of E-NTPDase and E-ADA.

### **2.4. Hematological evaluation**

The packed cell volume (haematocrit) was obtained by centrifugation using a microcentrifuge (Sigma) at 14.000 r.p.m. for 5 min. Leukocytes count determination were performed using an automated cell counter (Vet Auto Haematology Analyser, model BC 2800). For morphological evaluation of the blood and differential count of white blood cells, the blood smears were stained using a Diff-Quick commercial kit and visualized under the microscope (Schalm, 1970).

### **2.5. Mensuration of immunoglobulins**

The immunoglobulins levels were measured to confirm the inflammatory process. Serum IgG and IgM concentrations were determined using immunonephelometry on a



Behring a Nephelometer BN II (Dade Behring – USA) using reagents from Dade Behring. Samples were automatically diluted with a specific diluent and measured after 10 minutes. Polystyrene particles were coated with a specific monoclonal antibody for each human protein, forming an agglutinate which disperses the light irradiated in the presence of the analysed protein. The intensity of scattered light depends of protein concentration in the sample. This evaluation was performed by comparison with standards of known concentration (Dati et al., 1996).

## **2.6. Lymphocyte Separation**

Lymphocytes were also obtained from whole blood with EDTA by gradient separation using Ficoll-Histopaque™ plus, according to the technique described by Böyum (1968). After separation, lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells excluding 0.1% Trypan blue and measuring lactate dehydrogenase activity (Strober, 2001).

Protein concentrations of the lymphocytes were determined by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as the standard.

## **2.7. Enzymatic assay in lymphocytes'**

### **2.7.1. E-NTPDase activity**

After the isolation of lymphocytes, E-NTPDase activity was determined according to the method described by Leal et al., (2005). Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/mL and 20 µL of intact cells (2–4 µg protein) were added to a reaction medium containing 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 120mM NaCl, 5.0mM KCl, 60mM glucose and 50mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µL, and preincubated for 10 min at 37 °C. The reaction was started by the addition of ATP or ADP as substrate at a final concentration of

2.0mM and was stopped with 5% trichloroacetic acid (TCA). All the samples were run in triplicate, and enzymes (intact lymphocytes) were added to the control after the addition of TCA in order to correct the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan et al., (1986) and enzymatic activity was reported as nmol of Pi released/min/mg protein.

#### 2.7.2. E-ADA activity

E-ADA activity was measured spectrophotometrically in lymphocytes by the method of Giusti and Gakis (1971). The reaction was started by addition of the substrate (adenosine) to a final concentration of 21 mmol/L and incubation carried out for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding 106 mmol/L/0.16 mmol/L phenol-nitroprusside/mL solution. The reaction mixtures were immediately mixed to 125 mmol/L/ 11 mmol/L alkalinehypochlorite (sodium hypochlorite) and vortexed. Ammonium sulfate 75 μmol/L was used as ammonium standard. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 650 nm. The specific activity is reported as μ/L in lymphocytes.

### 2.8. Statistical analysis

The data presented **normally distributed and** were submitted to analysis of variance followed by the student t test ( $P < 0.05$ ). The effect of E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes on number of lymphocytes was analyzed by linear correlation. The analyses were performed using SAS statistical package (SAS Institute, Cary, NC, USA) with a significance level of 5% ( $P < 0.05$ ).

### **3. Results**

#### **3.1. Course of infection and hematologic parameters**

During the infection was not observed clinical manifestations and changing the behavior of animals in both groups. During sample collection, the presence of tachyzoites was found in the small volume of peritoneal fluid of group B. The hematocrit decreased ( $P<0.05$ ) in the infected groups on day 10 p.i. when compared to the control group, whereas total leukocytes and lymphocytes showed an increase of their levels when compared to the control group, also on day 10 p.i. (Figure 1). No significant difference in the number of total neutrophils, eosinophils and monocytes between groups.

#### **3.2. Immunoglobulins levels**

Analyzing the immunoglobulin levels (Figure 2) was possible to observe an increase of IgM levels on days 5 and 10 p.i. ( $P<0.01$ ) when it was compared to the control group, while IgG levels were increased only on day 10 p.i. ( $P<0.01$ ).

#### **3.3. E-NTPDase and E-ADA activity**

The capacity of the peripheral blood lymphocytes to hydrolyze extracellular ATP and ADP by E-NTPDase was evaluated in this study (Figure 3), showing a increase of ATP hydrolysis on days 5 ( $P<0.05$ ) and 10 ( $P<0.01$ ) p.i., and a increase of ADP hydrolysis on day 10 ( $P<0.01$ ) p.i..

E-ADA activity on lymphocytes was also increased in both evaluated periods ( $P<0.01$ ) when compared with the control group (Figure 4).

### 3.4. Analyses of correlation

Statistical analysis demonstrates a positive correlation between the number of lymphocytes and E-NTPDase activity in lymphocytes on day 10 p.i. to ATP ( $r$ : 0.74) and ADP ( $r$ : 0.69) substratum. A positive correlation between the number of lymphocytes and ADA activity in lymphocytes on day 5 ( $r$ : 0.56) and 10 ( $r$ : 0.83) post-infection.

## 4. Discussion

In toxoplasmosis a proliferation of tachyzoites results in the infection of neighboring cells and necrosis, which can be associated with an intense mononuclear cell reaction (Evans and Schwartzman, 1991). Altered haematological and biochemical blood parameters are rarely described in patients with acute toxoplasmosis (McCabe et al., 1987, Moscatelli et al., 2006); however, it was observed a hematocrit reduction on day 10 p.i. In this context, Johnson et al. (2003) demonstrated that anemia accompanies the acute phase of *T. gondii* infection and that depletion of IFN- $\gamma$  suppresses this anemia, as well as these authors demonstrated that mice lacking the capacity to produce fibrin, a product of the coagulation pathway, display exacerbated anemia and profound hepatic hemorrhage during acute toxoplasmosis. It is well known that continuous INF- $\gamma$  production is necessary for control of both acute and chronic infection with *T. gondii* (Aliberti, 2005) and it plays a role in driving stage conversion from the rapidly dividing tachyzoite form found in acute infection to the bradyzoite stage found in chronic infection (Bohne et al., 1993) and suppresses conversion from bradyzoites to tachyzoites during chronic infection (Jones et al., 1986). More recently Mullarky et al. (2007) confirmed the findings reported by Johnson et al., (2003) and added the information that acute *T. gondii* infection significantly increased the expression of IL-15 and its action suppresses erythropoiesis and/or impairs release of reticulocytes from bone marrow during acute toxoplasmosis without significantly affecting IFN- $\gamma$  levels. Therefore, the pathological

stimulation of these factors (INF- $\gamma$  and IL-15) and reduction in fibrin production by the *Toxoplasma* infection during the acute phase (as reproduced in this study) may be in charge of the hematocrit reduction observed on day 10 p.i. Finally, one of the laboratory hallmarks of toxoplasmosis is lymphocytosis and the presence of atypical lymphocytes (Tourani et al., 1985). Our data demonstrate a leukocytosis by lymphocytosis on day 10 p.i., probably in response to the tachyzoites proliferation during the infection. According to Tracey (2002) an exposure to pathogenic threats activates inflammatory reactions, followed by a fast and crucial anti-inflammatory response.

Concomitant with anti-inflammatory response usually is mounted an humoral response, which is characteristic of infection with *T. gondii*, providing protection of the host, thereby avoiding the rapid development of tachyzoites and thus preventing severe infection. A characteristic curve of humoral immune response was obtained in our study, with levels of IgM increased in both evaluated periods, as well as IgG increased only during on day 10 p.i.. The immune response anti *T. gondii* is usually mild, it does not trigger significant immunopathological changes in normal patients, resulting in mild symptoms such as fever and lymphadenopathy (Denkers and Gazzinelli, 1998; Yap et al., 2000), supporting the normal behavior of the experimental animals of this study.

Besides the hematological and immune assays carried out at this experiment, the measurement of E-NTPDase activity in rats infected with *T. gondii* was also performed, with results clearly demonstrating a change in ATP and ADP hydrolysis. In the immune system, ATP can act as a pro-inflammatory or an anti-inflammatory mediator (Di Virgilio, 2005; Boeynaems and Communi, 2006; Di Virgilio et al., 2009) depending on its extracellular concentration, as well as P2 receptor subtypes stimulated on cell surface. An increase in ATP hydrolysis was observed on the 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days p.i. in the infected group. At this time, the animals were at the beginning of infection and likely with elevated levels of extracellular ATP

(Figure 5). However, at this moment probably E-NTPDase increased its activity due to the high levels of its substrate, consequently leading to a reduction of extracellular levels of ATP. At low concentration, extracellular ATP possesses affinity for P2Y receptors subtype on the surfaces of lymphocytes. These purinergic receptors, when stimulated, develop a down-modulation of pro-inflammatory cytokines and stimulate the Th2 immune response leading to the production of anti-inflammatory cytokines, protection from oxidative damage and down-production of oxygen radicals in whole blood (Bours et al., 2006). P2Y receptor signaling may be an important stop signal to prevent excessive stimulation of inflammation, avoiding excessive cellular damage (Di Virgilio et al., 2009). It is important to emphasize that, concerning to mechanisms of self defense of the parasite, it was already established that *T. gondii* produces (E-NTPDase; Bermudes et al., 1994). May this self of E-NTPDase production also contribute to a reduction of extracellular levels of ATP and ADP (and consequent increase of ADO discussed above), driving to a production of anti-inflammatory cytokines in order to protect the parasite of the immune system or even reducing the direct damage on the parasite.

The roles of ADP remain unknown in lymphocytes (Dombrowski et al., 1998), being it mainly related to platelet aggregation and thromboregulation (Zimmermann, 1996). In our experimental study ADP hydrolysis was significantly increased in the infected animals at the 10<sup>th</sup> day p.i., which probably would lead to its extracellular decrease. It is well established that the increase in the expression of E-NTPDase leads to an enhancement of ATPase and ADPase activities (Wang et al., 1997) and consequently major hydrolysis of ATP and ADP, leading to the formation of AMP, and then adenosine (Ado). Ado acts as an endogenous regulator of innate immunity, protecting the host from excessive tissue injury associated with strong inflammation (Rathbone et al., 1999; Beraudi et al., 2003; Hasko and Cronstein, 2004; Sitkovsky and Ohta, 2005; Burnstock, 2006; Desrosiers et al., 2007). Our results

demonstrated an increased activity of E-ADA in both evaluated times probably due to the high concentrations of adenosine generated by the increased hydrolysis of ATP and ADP. Adenosine acts as a sensor and provides information to the immune system about tissue damage or acute inflammatory changes occurring in the vicinity of the immune system (Kumar and Sharma, 2009). Adenosine stimulates A2 receptors couple to stimulatory G proteins (Gs), which typically suppress cell responses upregulating intracellular cyclic AMP levels. Thus, Ado-mediated A2 receptor signaling may down-regulate neutrophil effector functions, stimulate the Th2 cell-stimulatory capacity of dendritic cells and inhibit lymphocyte effector functions (Bours et al., 2006). Therefore, Ado in high concentrations can act on purinergic receptors, attenuating inflammation and tissue damage, concomitantly with the down regulation supposedly provided by the enhanced activity of E-NTPDase found in our study (Figure 5).

E-NTPDase and E-ADA are essential to the regulation of purinergic signaling mediated by extracellular ATP and Ado. Based on E-NTPDase and E-ADA increased activities observed on lymphocytes, it is possible to suggest their involvement in an anti-inflammatory response, consisting of a modulatory response, preventing excessive tissue damage caused by the infection with *Toxoplasma gondii*.

## References

- Aliberti, J., 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews - Immunology* 5, 162–170.
- Beraudi, A., Traversa, U., Villani, L., Sekino, Y., Nagy, J.I., Poli, A., 2003. Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain. *Neurochemistry International* 42, 455–463.

- Bermudes, D., Peck, K.R., Afifi Afifi, M., Beckers, C.J.M., Joiner, K.A., 1994. Tandemly Repeated Genes Encode Nucleoside Triphosphate Hydrolase Isoforms Secreted into the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma gondii*. The Journal of Biological Chemistry. 269, 46.
- Boeynaems, J.M., Communi, D., 2006. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. The Journal of Investigative Dermatology 126, 943-944.
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in c interferon-treated mouse macrophages. Infection and Immunity 61, 1141–1145.
- Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C., 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacology & Therapeutics 112, 358-404.
- Böyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 97, 77–89.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.
- Burnstock, G., 2006. Purinergic signaling – an overview. Novartis Found Symposium 276, 26–48.
- Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. Analytical Biochemistry 157, 375–380.
- Dati, F., Schumann, G., Thomas, L., Aguzzi, F., Baudner, S., Bienvenu, J., 1996. Consensus of group of professional society and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on standardization against the



- IFCC/BRC/CAP Reference Material (CRM). *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 34, 517-520.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B., Robson, S.C., 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1257-1265.
- Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 1, 569-588.
- Desrosiers, M.D., Katherine, M.C., Fakir, M.J., Stephens, L.A., Jama, F.M., Shameli, A., Mehal, W.Z., Santamaria, P., Shi, Y., 2007. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *The Journal of Immunology* 179, 1884–1892.
- Di Virgilio, F., 2005. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal* 1,205-209.
- Di Virgilio, F., Boeynaems, J.M., Robson, S.C., 2009. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 507-513.
- Dombrowski, K. E., Bewer, K. A., Kapp, J. A., 1998. Ecto-ATPase: An activation marker necessary for effector cell function. *Immunological Reviews* 161, 111–118.
- Dubey, JP., 2012. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd edn. Boca Raton: CRC Press, 313 pp.
- Evans, T.G., Schwartzman, J.D., 1991. Pulmonary toxoplasmosis. *Seminars in Respiratory Infections* 6, 51-57.
- Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Fogli, E., Sacchetto, V., Benini, A., Leung, E., MacLennan, S., Borea, P.A., 2007. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal* 3, 109-116.

- Giusti, G., Gakis, C., 1971. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 12, 417-425.
- Hasko, G., Cronstein, B.N., 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in immunology* 25, 33–39.
- Johnson, L. L., Berggren, K.N., Szaba, F.M., Chen, W., Smiley, S.T., 2003. Fibrin-mediated protection against infection-stimulated immunopathology. *Journal of Experimental Medicine* 197,801 806.
- Jones, T.C., Bienz, K.A., Erb, P., 1986. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of c interferon. *Infection and Immunity* 51, 147–156.
- Kumar, V., Sharma, A., 2009. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *The European Journal of Pharmacology* 616, 7–15.
- Langston, H.P., Ke, Y., Gewirtz, A.T., Dombrowski, K.E. and Kapp, J.A., 2003. Secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *The Journal of Immunology* 170, 2962-2970.
- Leal, D. B. R., Streher, C. A., Neu, T. N., Bittencourt, F. P., Leal, C. A. M., Silva, J. E. P., Morsch, V. M. and Schetinger, M. R. C., 2005. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ectodiphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1721, 9–11.
- McCabe, R.E., Brooks, R.G., Dorfman, R.F., Remington, J.S., 1987. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Reviews of Infectious Diseases* 9, 754-774.
- Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J. and Smith, N.C., 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Parasitology* 39, 23–39.

- Moscatelli, G., Altcheh, J., Biancardi, M., Lapeña, G., Ballering, G., Freilij, H., 2006. Acutetoxoplasmosis: clinical and laboratory data in eleven patients. *Anales de Pediatría* 65, 551-555.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 2003. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News & Perspectives* 16,133-140.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A.R., Reed, J.K., Ciccarello, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology* 59, 663–690.
- Schalm, O.W., 1970. *Veterinary hematology*, 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 664 pp.
- Sitkovsky, M.V., Ohta, A., 2005. The ‘danger’ sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends in Immunology* 26, 299-304.
- Strober, W., 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. In *Current Protocols in Immunology*, A.3B.1–A.3B.2. Edited by J. Coligan, A. Kruisbeek, D. Margules, E. Shevach & W. Strober.
- Tourani, J.M., Israel-Biet, D., Venet, A., Andrieu, J.M., 1985. Unusual pulmonary infection in a puzzling presentation of AIDS. *Lancet*. 1, 989.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature*. 420,853–859
- Wang, T.F., Rosenberg, P.A., Guidotti, G., 1997. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Molecular Brain Research* 47,295-302.
- Yap, G., Pesin, M., Sher, A., 2000. IL-12 is required for the maintenance of IFN- $\gamma$  production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 165, 628-631.
- Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 49, 589–618.

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44-56.

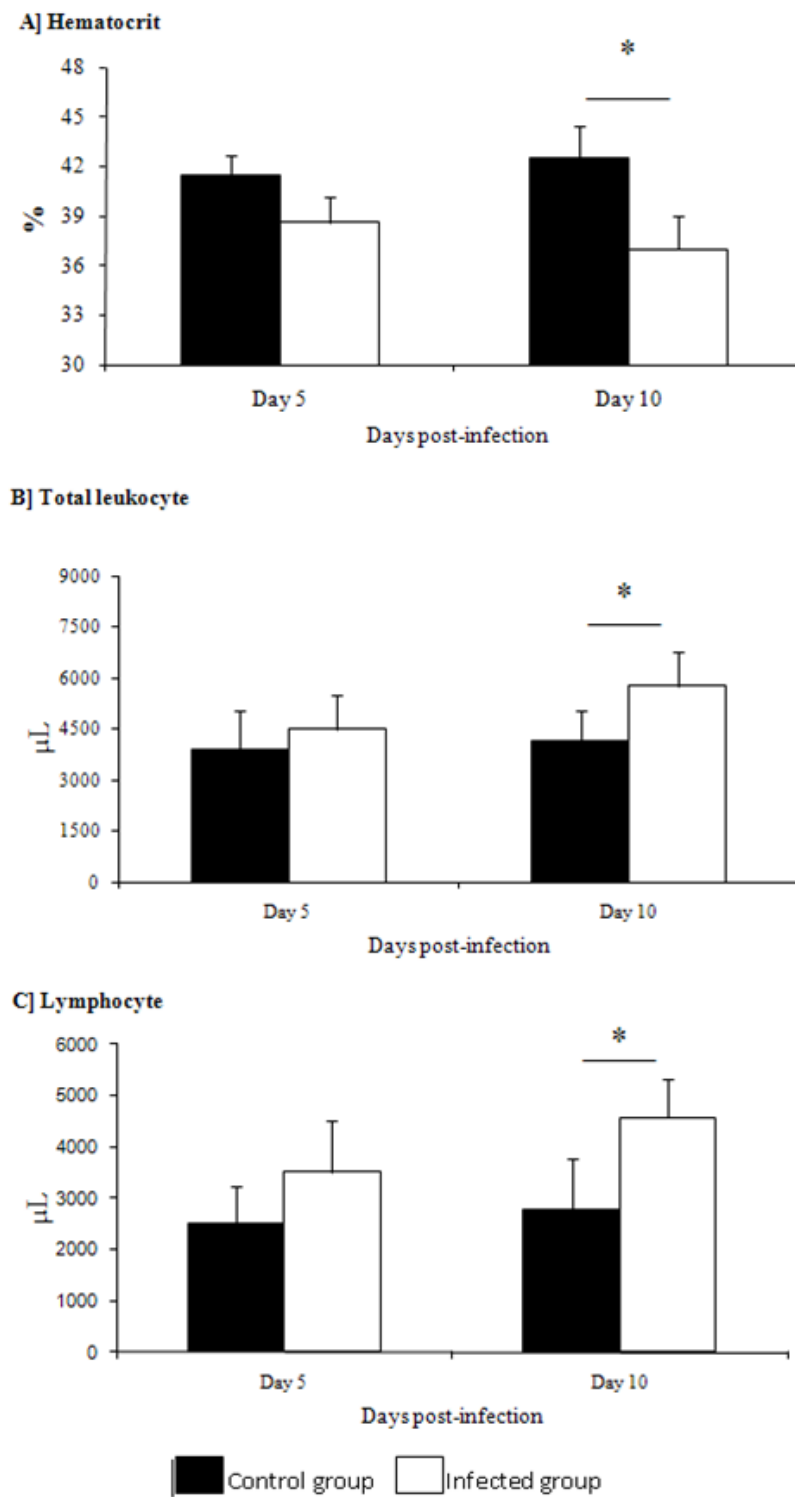


Fig. 1: Hematocrit (A), total leukocytes (B) e lymphocytes of rats infected with *Toxoplasma gondii* compared to control in day 5 to 10 post-infection. (\* $P < 0.05$ )

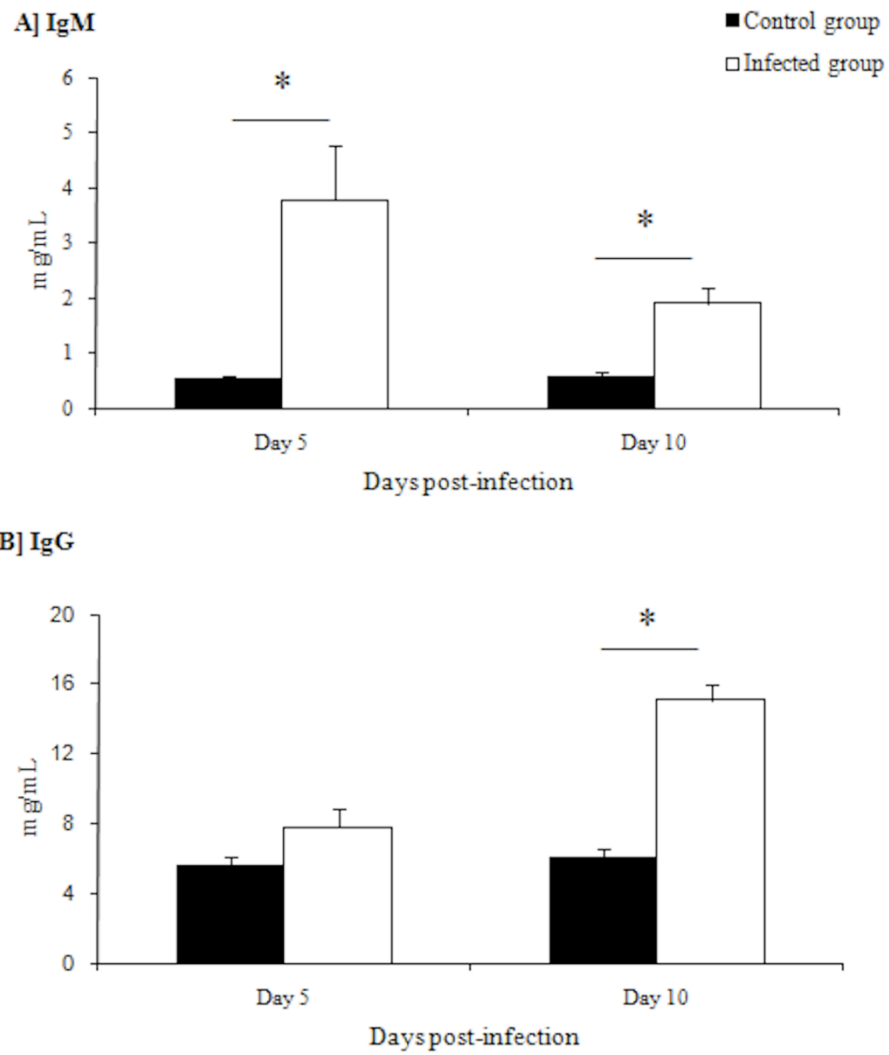


Fig. 2: Levels of immunoglobulins in rats infected with *Toxoplasma gondii* compared to control in days 5 and 10 post-infection: IgM (A) and IgG (B). (\* $P < 0.01$ )

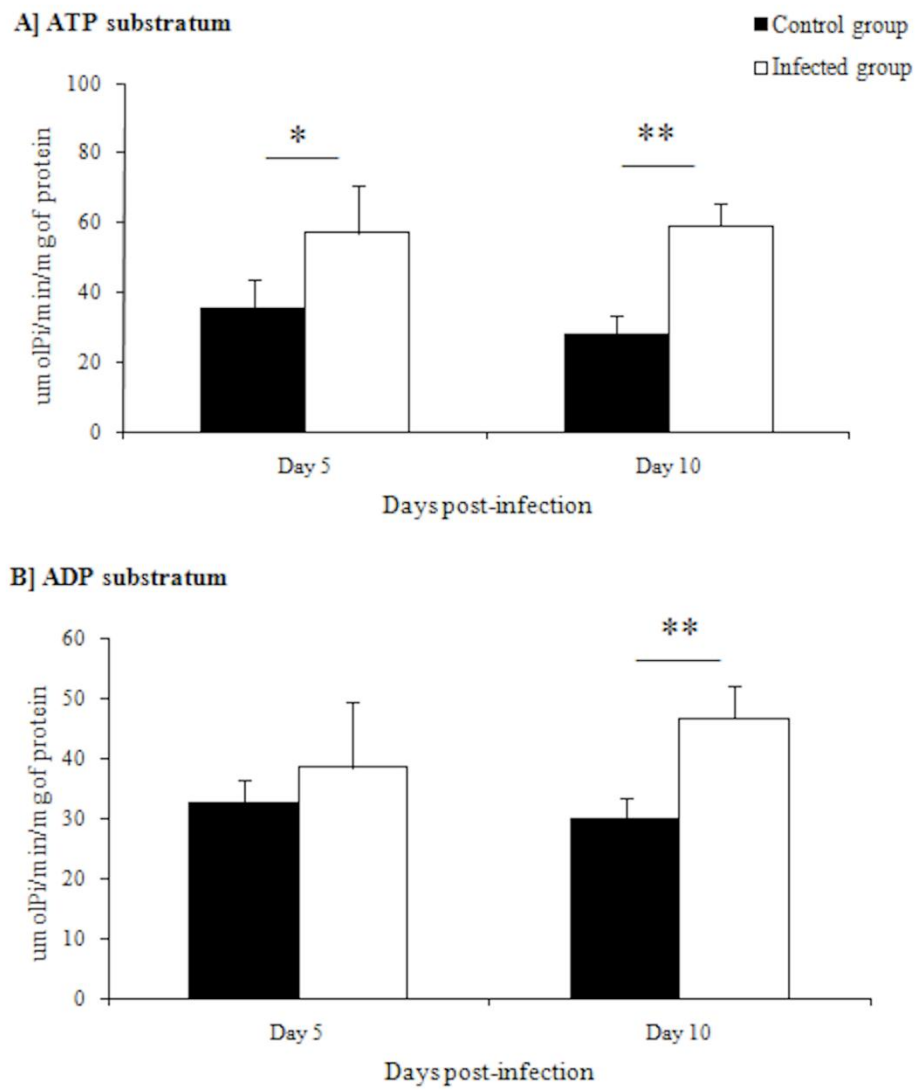


Fig. 3: E-NTPDase activity in lymphocytes of rats infected with *Toxoplasma gondii* (Day 5 and 10 PI) compared not-infected (n=10) for ATP [A] and ADP [B] substratum. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )

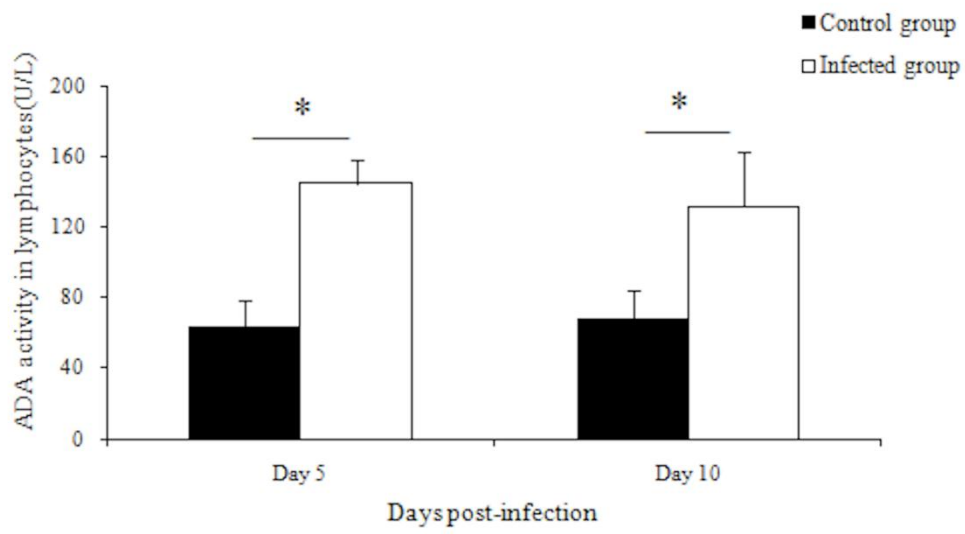


Fig. 4: E-ADA activity in lymphocytes of rats infected with *Toxoplasma gondii* compared not-infected at days 5 and 10 PI (\* $P < 0.01$ )



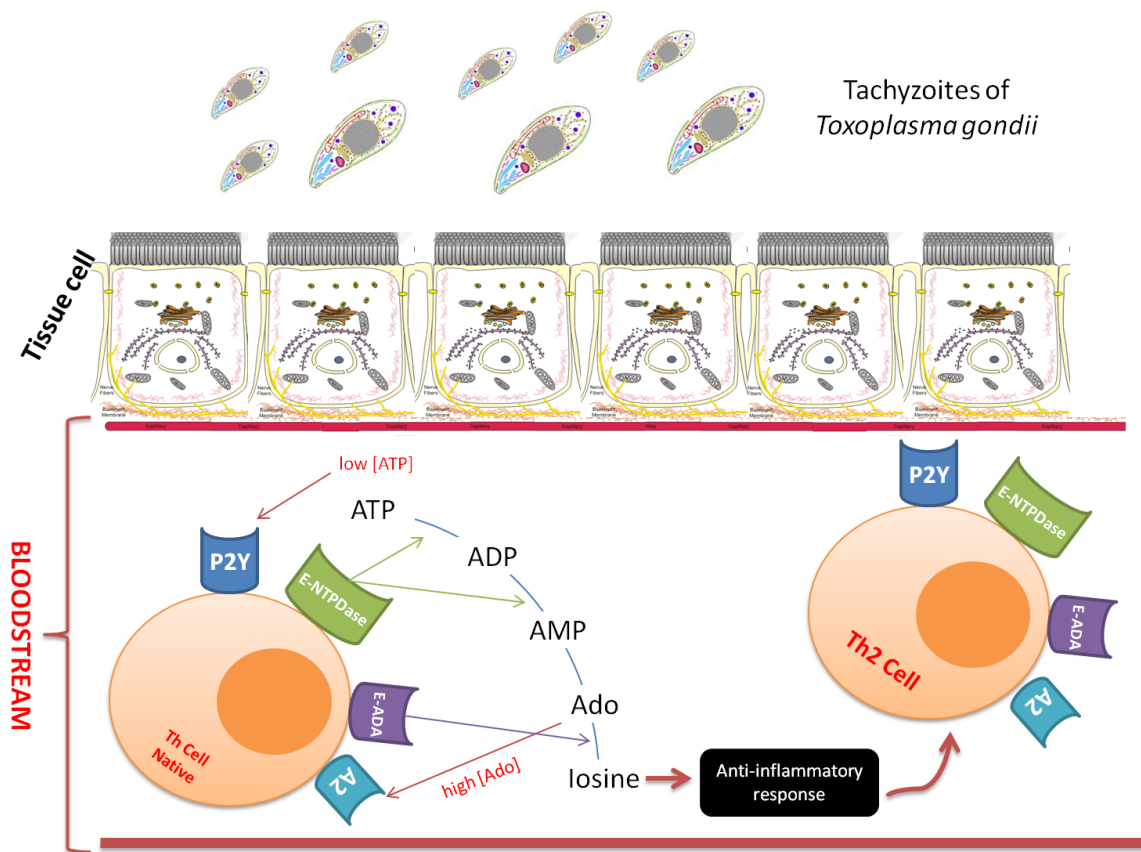


Fig. 5. Participation of E-NTPDase and E-ADA in the lymphocytes of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii* in the modulation of inflammatory and immune responses. Increased E-NTPDase activity leading to low concentration of ATP (acting via P2Y receptor), along with increased Adenosine levels as a mechanism to cause down-modulation of pro-inflammatory cytokines, differentiation of naive Th cells into Th2 lymphocytes, generating an anti-inflammatory environment.



## 4 CAPÍTULO II

### 4.1 Artigo 2

#### **Influence of *Toxoplasma gondii* Acute Infection on Cholinesterase Activities of Wistar Rats**

Alexandre A. Tonin, Aleksandro S. Da Silva, Maria L. Thorstenberg, Lívia G. Castilhos,  
Raqueli T. França, Daniela B.R. Leal, Marta M.M.F. Duarte, Fernanda F. Vogel, Mario L. de  
La Rue, Sonia T.A. Lopes<sup>a</sup>

Artigo publicado em: *Korean Journal of Parasitology*, Vol. 51, No. 4: 421-426, August 2013.

DOI: [10.3347/kjp.2013.51.4.421](https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.421)

Anexo II

**Influence of *Toxoplasma gondii* Acute Infection on Cholinesterase Activities of Wistar Rats**

Alexandre A. Tonin<sup>a\*</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>b</sup>, Maria L. Thorstenberg<sup>c</sup>, Livia G. Castilhos<sup>c</sup>, Raqueli T. França<sup>a</sup>, Daniela B.R. Leal<sup>c</sup>, Marta M.M.F. Duarte<sup>d</sup>, Fernanda F. Vogel<sup>d</sup>, Mario L. de La Rue<sup>c</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Small Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>d</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Luteranda do Brasil - ULBRA. Santa Maria, Brazil.

\*Corresponding author. Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Prédio 20, Sala 4235.

CEP 97105-900. Santa Maria – RS, Brazil Tel.: + 55 55 32208885. E-mail:

[tonin.aat@gmail.com](mailto:tonin.aat@gmail.com)

## ABSTRACT

Several studies show the mechanisms and importance of immune response to *Toxoplasma gondii* infection and the notably role of cholinesterase in inflammatory reactions; however, the association between them has not yet been investigated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the acetylcholinesterase (AChE) activity in blood and lymphocytes and the activity of butyrylcholinesterase (BChE) in serum of rats experimentally infected with *T. gondii* during the acute phase of toxoplasmosis. For that, an *in vivo* study was performed with evaluations of AChE and BChE activities on days 5 and 10 post-infection. Activity of AChE in blood was increased on day 5 PI, while in lymphocytes its activity was enhanced on days 5 and 10 PI ( $P<0.05$ ). No significant difference was observed between groups regarding to the activity of BChE in serum. A positive ( $P<0.01$ ) correlation between AChE activity and number of lymphocytes was observed. The role of AChE as an inflammatory marker is well known in different pathologies; thus, our results lead to the hypothesis that AChE has an important role in the modulation of early immune response against *T. gondii* infection.

**Keywords:** Acute toxoplasmosis; AChE; BChE.

## 1. Introduction

*Toxoplasma gondii* is a ubiquitous coccidian parasite of the Phylum Apicomplexa, the largest and most important group of obligate parasites. It is unusual within this group in its capacity to parasitize a diverse array of cell types and infect virtually any warm-blooded animal [1]. *T. gondii* is a remarkably successful organism; around one-third of the world's population is seropositive for this parasite. Seroprevalence increases with age and varies around the world [2]. Thus, in the USA, the overall seroprevalence is around 20–25% but in El Salvador, France or Brazil, for example, it may be as high as 75–80%.

Exposure to pathogenic threats activates inflammatory reactions, followed by a fast and crucial anti-inflammatory response [3]. This limits the inflammatory processes below a certain threshold, ascertaining survival and avoiding autoimmune diseases or spreading of the inflammatory components into the bloodstream, which may lead to septic shock [3]. Primary infections with *T. gondii* stimulate production of high levels of interleukins, such as IL-12 and IFN- $\gamma$ , by cells of the innate immune system, being central efforts to resistance to the disease [4]. In recent years, descriptions about the participation of the cholinergic system in the inflammatory response has been described [5, 6, 7], reason why it was investigated in the toxoplasmosis.

Cholinergic signaling is notably involved in anti inflammatory reactions [8] and cholinesterases enzymes are present in cholinergic and non-cholinergic tissues. They are divided into two classes (acetylcholinesterase, AChE; and butyrylcholinesterase, BChE) according to their catalytic properties and specificity for substrates, sensitivity to inhibitors and tissue distribution [9,10]. AChE and BChE both catalyse the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), a fundamental process in regulating the cholinergic system [10,11]. AChE (EC 3.1.1.7) is a membrane-bound enzyme mainly found in the brain, muscles, erythrocytes, lymphocytes and cholinergic neurons [9,12] that preferentially hydrolyses esters with acetyl group. Thus, the vagus nerve releases acetylcholine (ACh) when stimulated (either electrically or pharmacologically), inhibiting activation of macrophages and release of pro-inflammatory cytokines (e.g., interleukin-6 [IL-6], tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ], IL-1, and IL-18). The lymphocytes synthesize ACh, which is degraded by AChE, and in consequence of this, the complete cholinergic repertoire of immune cells was termed the lymphocytic cholinergic system [9].

Based on the knowledge that toxoplasmosis has a high stimulation on the immune system [4], added to the immune modulator role of the cholinergic system, the aim of this

study was to evaluate the AChE activity in blood and lymphocytes, as well as BChE activity in serum of rats experimentally infected with *T. gondii* during the acute phase of toxoplasmosis. Rats were chosen because they are more resistant to toxoplasmosis, providing conditions to investigate the possible participation of cholinesterase's in the immune response during the acute phase of the disease.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Ethics statement**

The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), number 003/2011. Experiments were performed according to the Brazilian regulations for experimentation animal (CONCEA). All efforts were made to minimize suffering of animals.

### **2.2. Experimental Animals**

Twenty four adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), average 60 days old and 200 g in weight, from the central vivarium of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) were used. The animals were kept in an experimental room with controlled temperature and humidity (25°C; 70% RH). They were fed a commercial ration, with water *ad libitum*, and submitted to a period of 7 days of adaptation.

### **2.3. Strain *Toxoplasma gondii* and preparation of inoculum**

For this experiment, it was utilized a strain of *T. gondii* (RH, isolated by Sabin, 1941) kept in liquid nitrogen in laboratory. Firstly, one mouse was inoculated with tachyzoites of *T. gondii*. Four days later, peritoneal fluid containing the parasite was collected and inoculated

into other mice. This procedure was repeated three times, in order to reactivate the parasite virulence and for obtaining a large number of tachyzoites of *T. gondii*.

#### **2.4. Experimental design and sample's collection**

The twenty four animals were divided in two groups (A and B - 12 animals/each group), and from these again divided in four sub groups (A1, A2, B1 and B2 - 6 animals/each group). Groups A and B served as uninfected and infected, respectively. A volume of 0.5 ml of peritoneal fluid containing  $1.2 \times 10^7$  tachyzoites was inoculated in group B (12 rats Wistar), intraperitoneally. The volume of 0.5 ml saline was administered in group A, by the same via.

On day 5 post infection (PI) (subgroup A1 and B1) and day 10 PI (subgroup A2 and B2) the sample collections were performed. The animals were anesthetized in chamber with isoflurane for collection of blood by cardiac puncture (8mL). The storage of the samples was considered accordingly to the analysis. Thus, part of the material collected was allocated in tubes containing anticoagulant (EDTA 10%) for separation of lymphocytes (4mL) and analysis of hemogram and blood AChE (1mL). The volume of 3mL was stored in a tube without anticoagulant to obtain serum to cytokines and BChE analysis.

#### **2.5. Hematological evaluation and cytokines**

Complete blood count and haemoglobin determination were performed using an automated cell counter (Vet Auto Haematology Analyser, model BC 2800). For morphological evaluation of the blood and differential count of white blood cells, the blood smears were stained using a Diff-Quick commercial kit and visualized under the microscope. Mean corpuscular volume and mean corpuscular haemoglobin concentrations were calculated according to Feldman et al. [13].



The quantification of cytokines was performed in order to establish that the immune response against infection by *T. gondii* occurred, supporting our findings on the cholinesterase. The quantification of pro-inflammatory cytokines was performed by ELISA using commercial kits for rat IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to manufacturer's instructions.

## **2.6. Lymphocyte Separation**

Lymphocytes were also obtained from whole blood with EDTA by gradient separation using Ficoll-Histopaque™ plus, according to the technique described by Böyum [14]. After separation, lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells excluding 0.1% Trypan blue and measuring lactate dehydrogenase activity [15]. Protein concentrations of the lymphocytes were determined by the Coomassie blue method [16] using bovine serum albumin as the standard.

## **2.7. AChE activity in total blood**

Samples blood were diluted 1:50 (v/v) in lysis solution (0.1 mmol/L potassium/sodium phosphate buffer containing 0.03% Triton X-100) to determine AChE activity in blood. Subsequently, the sample were frozen for ten days and then processed. The AChE enzymatic assay in total blood was done by the method of Ellman et al. [17] as modified by Worek et al. [18]. The incubation system was composed of 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium phosphate buffer pH 7.4, 5,59-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 10 mmol L<sup>-1</sup> for haemolysis of blood. The increase in absorbance was registered over 2 min at 436 nm. The specific activity of whole-blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and haemoglobin (Hb) concentration and the results were expressed as  $\mu\text{m}/\text{Umol}$  of Hb.

## **2.8. AChE activity in lymphocytes**

After isolation of the lymphocytes, AChE activity was determined according to the method described by Fitzgerald and Costa [19]. Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg mL<sup>-1</sup>, and 0.2 mL of intact cells was added to a solution containing, 1.0 mmol acetylthiocholine (ACh), 0.1 mmol DTNB and 0.1 mmol phosphate buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30 min at 27 °C the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. AChE activity was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content and the results were expressed as  $\mu\text{mol ACh mg of protein}$ .

## **2.9. BChE activity in serum**

The BChE enzymatic assay in the serum was determined by method of Ellman et al. [17] using the substrate butyrylthiocholine (BCh). The sample was pre-incubated at 37 °C for 2 min, and reading was performed for 2 min at intervals of 20–20 s on a spectrophotometer at 412 nm. The sample analysis was carried out in duplicate, and the enzyme activity was expressed in  $\mu\text{moles BCh/h/mg de protein}$ .

## **2.10. Statistical analysis**

The data were submitted to analysis of variance followed by the student test  $t$  ( $P < 0.05$ ). The effect of AChE activity in lymphocytes on number of lymphocytes was analyzed by linear correlation. The analyses were performed using SAS statistical package (SAS Institute, Cary, NC, USA) with a significance level of 5% ( $P < 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Course of infection, hematologic parameters and cytokines

During the infection was not observed clinical manifestations and changing the behavior of animals in both groups. On day 5 PI, there was no significant ( $P>0.05$ ) alteration hematological between groups. The number of erythrocytes and the hemoglobin concentration were decreased ( $P<0.05$ ) in the infected groups on day 10 PI when compared to the control group, whereas total leukocytes and lymphocytes presented an increase of their levels when compared to the control group (Table 1).

In this study, we found that infection with *T. gondii* in rats led to the occurrence of an inflammatory process. This is because the IL-1, IL-6, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels were increased on days 5 and 10 post-infection in all groups when compared to the control group ( $P<0.05$ ).

#### 3.2. AChE activity in total blood and lymphocytes

On day 5 PI, the activity of AChE in total blood increased significantly ( $P<0.01$ ) in the infected group, when compared to the control group, however on day 10 PI no differences between infected and control group were observed (Figure 1A). AChE activity in lymphocytes were increased in both moments, days 5 ( $P<0.01$ ) and 10 ( $P<0.05$ ) PI, when the infected groups were compared to the control group (Figure 1B).

Statistical analysis demonstrates a positive correlation ( $r: 0.67$ ) between the number of lymphocytes and AChE activity in lymphocytes on day 10 PI ( $P<0.01$ ). However, on day 5 PI no correlation was observed.

#### 3.3. BChE activity in serum

No significant ( $P> 0.05$ ) difference was observed in the BChE activity in serum from rats infected with *T. gondii* compared healthy in both periods evaluated.

#### 4. Discussion

*Toxoplasma gondii* can invade every nucleated cell in the body, although the preferred target organs are the lymph nodes, brain, heart, and lungs. Proliferation of tachyzoites results in the infection of neighboring cells and necrosis, which can be associated with an intense mononuclear cell reaction [20]. Our data demonstrate that the number of lymphocytes, as well as total leukocytes was increased during the second sampling period, probably in response to the tachyzoites proliferation during the infection. In this study, we discuss the relationship of the cholinergic system with this white blood cells proliferation during the acute phase of an experimental infection with *T. gondii*.

It is well established and several investigations proved that blood cells possess a cholinergic system consisting of ACh muscarinic and nicotinic receptors (mAChR and nAChR, respectively), choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase [9, 21]. Our results show an increase in the whole blood (day 5 PI) and lymphocyte (days 5 and 10 PI) AChE activity. The activity of AChE in whole blood was increased on day 5 PI in our study, during the period of major parasitemia. Our hypothesis is that the elevation in its activity is directly related to the increased expression of the enzyme in erythrocytes as a response to a high parasitemia of the period. Our results are in accordance with Szelenyi [22], who describes a significant increase in AChE activity and mAChR expression in normal human peripheral blood lymphocytes as an early response to various stimuli. While the major expression and/or activity of the enzyme was supposedly on day 5 PI protecting the cells, the anti-inflammatory action simultaneously occurred, partially cleaning the parasite of the bloodstream, however, also reducing the erythrocytes and hemoglobin levels.

In the both phases (days 5 and 10 PI) an increase was observed in the AChE activity in lymphocytes when compared to not-infected animals. When there is an increase in the AChE activity, occurs a rapid degradation of ACh which is considered molecule with anti-

inflammatory action, since it binds to nicotinic receptors in lymphocytes surfaces, and thus inhibits the production of cytokines, serotonin, histamine, nitric oxide, lysosomal enzymes, prostaglandins and leukotrienes which are among the mediators of the inflammatory process (7, 9, 23, 24). It is noteworthy that the animals in this study presented the levels of pro-inflammatory cytokines were increased. In the present study, we found that the increase in AChE activity in lymphocytes is associated to lymphocytosis (day 10 PI), may provided a pro-inflammatory action in order to reduce the free ACh. It is known that ACh is produced within the lymphocytes [9]. Therefore, increasing the number of lymphocytes certainly increases the concentration of the free ACh, and consequently increases in AChE activity as an inflammatory action.

In this study, using rats as an experimental model, we did not found variation in the activity of BChE between groups infected and uninfected groups. Therefore, the enzyme BChE seems not to be involved in the immune response during the acute toxoplasmosis in rats, unlike what happened with AChE. However, when the activity of BChE was evaluated in serum and liver of mice infected with *T. gondii* (experimental model highly susceptible to the parasite), a reduction in this enzymatic activity was observed, associated with liver lesions, the major organ responsible for BChE synthesis [25]. Therefore, we believe that the difference between the studies is co-related to the experimental model used, leading the conclusions to the fact that alteration in the levels of this enzyme is much more related to liver injury, than to the immune response.

The results obtained in the present study demonstrate alterations in the activity of AChE in whole blood and lymphocytes associated with the increase of total leukocytes by lymphocytosis. AChE had its activity enhanced in lymphocytes, as well as total blood, may providing a pro-inflammatory action in order to reduce the free ACh, molecule which has anti-inflammatory action. Therefore, our results lead to the hypothesis that AChE has an

important role in the early modulation of immune response against *T. gondii* during the acute infection through an inflammatory effect, contributing to the response against the parasite. On the other hand, BChE seems not to be involved in the immune response of rats with acute toxoplasmosis.

## References

1. Dubey JP. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM & Kim K (Eds.), *Toxoplasma gondii*, the Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Academic Press, London, UK, 2007; 1–17.
2. Montoya JG, Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. Lancet 1965; 363: 1965–1976.
3. Tracey KJ. The inflammatory reflex. Nature 2002; 420: 853–859
4. Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ & Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 2009; 39: 23-39.
5. Da Silva AS, Monteiro SG, Gonçalves JF, Spanevello R, Schmatz R, Oliveira CB, Costa MM, França RT, Jaques JAS, Schetinger MRC, Mazzanti CM & Lopes STA. *Trypanosoma evansi*: Immune response and acetylcholinesterase activity in lymphocytes from infected rats. Exp Parasitol 2011; 127: 475-480.
6. Silva CB, Wolkmer P, Da Silva AS, Paim FC, Tonin AA, Castro VSP, Felin DV, Schmatz R, Gonçalves JS, Badke MRT, Morsch VM, Mazzanti CM & Lopes STA. Cholinesterases as markers of the inflammatory process in rats infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. J Med Microbiol 2012; 61: 278–284
7. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. Med Sci Monit 2007; 13: 214–221.

8. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW & Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458–462.
9. Kawashima K & Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 2003; 74: 675–696.
10. Kimura R, Ushiyama N, Fujii T & Kawashima K. Nicotine-induced  $Ca^{2+}$  signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line. *Life Sci* 2003; 72: 2155–2158.
11. Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH & Lockridge O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem* 2000; 75: 1320–1331.
12. Schetinger MRC, Porto NM, Moretto MB, Morsch VM, Da Rocha JBT, Moro F, Neis RT, Bittencourt S & Bonacorso HG. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. *Neurochem Res* 2000; 25: 949–955.
13. Feldman BF, Zinkl JG & Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
14. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clinical Clin Lab Invest* 1968; 97: 77–89.
15. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. In *Current Protocols in Immunology*, A.3B.1–A.3B.2. Edited by J. Coligan, A. Kruisbeek, D. Marguiles, E. Shevach & W. Strober, 2001.

16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
17. Ellman GL, Courtney KD, Andres V & Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88–95.
18. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C & Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 1999; 288: 73–90.
19. Fitzgerald BB & Costa LG. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 20: 210–216.
20. Evans TG & Schwartzman JD. Pulmonary toxoplasmosis. *Semin Respir Infect* 1991; 6: 51–57.
21. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A & Amenta F. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2002; 132: 147–55.
22. Szelényi J, Páldi-Haris P & Hollán S. Changes in the cholinergic system of lymphocytes due to mitogenic stimulation. *Immunol Letters* 1987; 16: 49–54.
23. Czura CJ & Tracey KJ. Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med* 2005; 257: 156–166.
24. Nizri E, Hamra-Amitay Y, Sicsic C, Lavon I & Brenner T. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 2006; 50: 540–547.
25. Da Silva AS, Tonin AA, Thorstenberg ML, Leal DBR, Figuera R, Flores MM, França RT, Camillo G, Vogel FSF, Rue M, Lopes STA. Relationship between butyrylcholinesterase



activity and liver injury in mice acute infected with *Toxoplasma gondii*. *Pathol Res Pract* 2013; 209: 95– 98.

Table 1: Means and standard deviation of the hematological parameters of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*.

Parameters	Days post-infection	Control group	Infected group
Total erythrocytes ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	05	6.40 <sup>a</sup> ( $\pm 0.25$ )	6.10 <sup>a</sup> ( $\pm 0.24$ )
	10*	6.42 <sup>a</sup> ( $\pm 0.20$ )	5.80 <sup>b</sup> ( $\pm 0.50$ )
Hemoglobin (g/dL)	05	12.50 <sup>a</sup> ( $\pm 0.30$ )	12.00 <sup>a</sup> ( $\pm 0.50$ )
	10*	12.00 <sup>a</sup> ( $\pm 0.36$ )	10.25 <sup>b</sup> ( $\pm 0.66$ )
MCV (fl)	05	62.9 <sup>a</sup> ( $\pm 1.20$ )	65.0 <sup>a</sup> ( $\pm 3.31$ )
	10	61.4 <sup>a</sup> ( $\pm 2.31$ )	63.0 <sup>a</sup> ( $\pm 3.60$ )
MCHC (%)	05	28.4 <sup>a</sup> ( $\pm 0.47$ )	28.9 <sup>a</sup> ( $\pm 1.3$ )
	10	28.2 <sup>a</sup> ( $\pm 0.27$ )	28.0 <sup>a</sup> ( $\pm 0.40$ )
Total leukocytes ( $/\mu\text{L}$ )	05	3900 <sup>a</sup> ( $\pm 1126$ )	4500 <sup>a</sup> ( $\pm 1345$ )
	10*	4120 <sup>a</sup> ( $\pm 900$ )	5750 <sup>b</sup> ( $\pm 918$ )
Neutrophils ( $/\mu\text{L}$ )	05	1126 <sup>a</sup> ( $\pm 650$ )	945 <sup>a</sup> ( $\pm 445$ )
	10	1197 <sup>a</sup> ( $\pm 512$ )	926 <sup>a</sup> ( $\pm 540$ )
Lymphocyte ( $/\mu\text{L}$ )	05	2608 <sup>a</sup> ( $\pm 730$ )	3480 <sup>a</sup> ( $\pm 1020$ )
	10*	2768 <sup>a</sup> ( $\pm 995$ )	4572 <sup>b</sup> ( $\pm 748$ )
Eosinophils ( $/\mu\text{L}$ )	05	84 <sup>a</sup> ( $\pm 43$ )	50 <sup>a</sup> ( $\pm 32$ )
	10	68 <sup>a</sup> ( $\pm 40$ )	160 <sup>a</sup> ( $\pm 104$ )
Monocytes ( $/\mu\text{L}$ )	05	82 <sup>a</sup> ( $\pm 52$ )	25 <sup>a</sup> ( $\pm 15$ )
	10	87 <sup>a</sup> ( $\pm 35$ )	92 <sup>a</sup> ( $\pm 61$ )

\* Means in the same line followed by different letters are statistically different among them by Tukey's test at 5% probability (\* $P < 0.05$ ). Different letters in the same line represent statistical differences

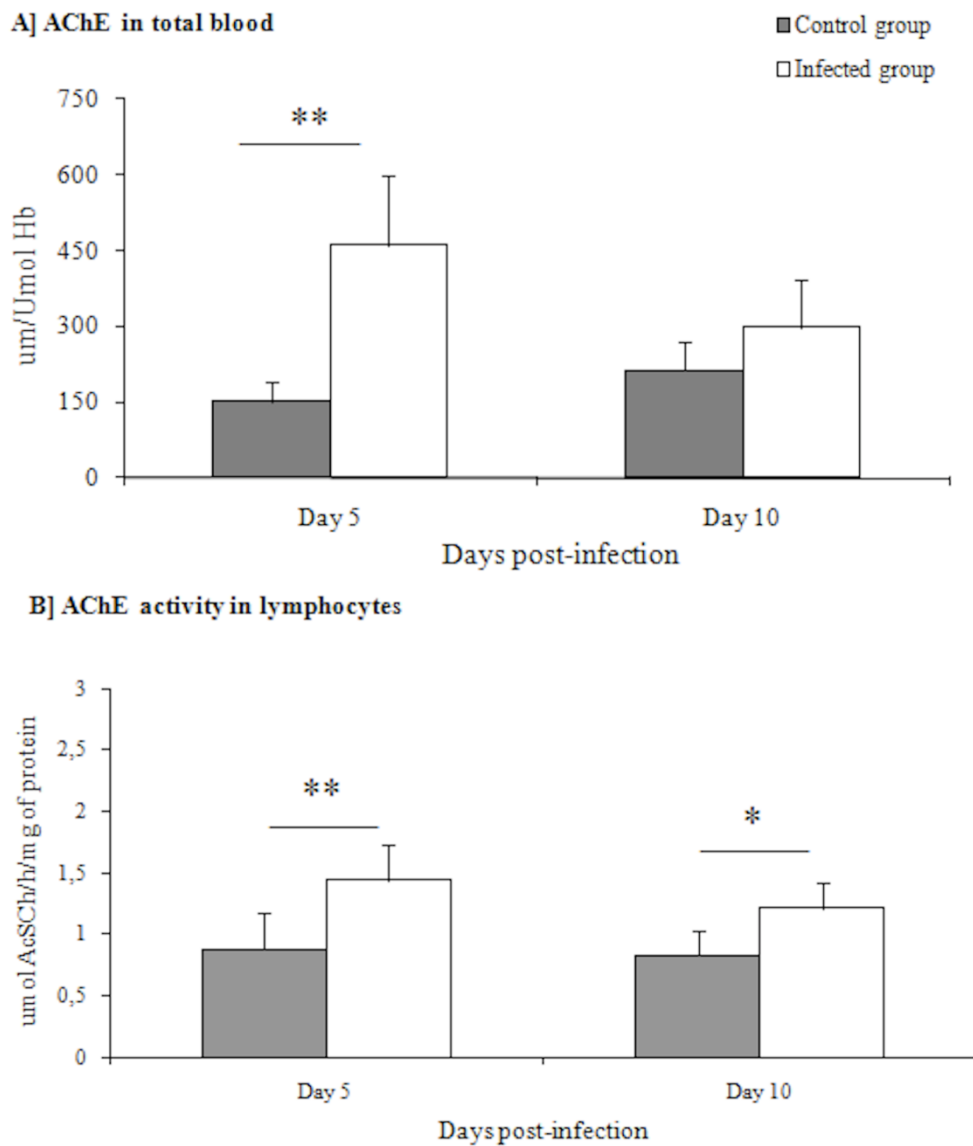


Figure 1: AChE activity in blood (A) and lymphocytes (B) of rats infected with *Toxoplasma gondii* (Day 5 and 10 PI) compared not-infected (Means and standard deviation; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).



## 5 CAPÍTULO III

### 5.1 Artigo 3

#### **Influence of infection by *Toxoplasma gondii* on purine levels and E-ADA activity in the brain of mice experimentally infected**

Alexandre A. Tonin, Aleksandro S. Da Silva, Stephanie S. Silveira, Cesar E.J. Moritz,  
Emerson A. Casali, Giovana Camillo, Mariana M. Flores, Rafael Fighera, Gustavo R. Thomé,  
Vera M. Morsch, Mario De La Rue, Fernanda S.F. Vogel, Sonia T.A. Lopes

Artigo publicado em: *Experimental Parasitology*, 142 (2014) 51-58.

DOI: 10.1016/j.exppara.2014.04.008

Anexo III

**Influence of infection by *Toxoplasma gondii* on purine levels and E-ADA activity in the brain of mice experimentally infected**

Alexandre A. Tonin<sup>a\*</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>a,b\*</sup>, Emerson A. Casali<sup>c,d</sup>, Stephanie S. Silveira<sup>c</sup>, Cesar E.J. Moritz<sup>c</sup>, Giovana Camillo<sup>e</sup>, Mariana M. Flores<sup>f</sup>, Rafael Figuera<sup>f</sup>, Gustavo R. Thome<sup>g</sup>, Vera M. Morsch<sup>g</sup>, Maria Rosa C. Schetinger<sup>g</sup>, Mario De La Rue<sup>a</sup>, Fernanda S.F. Vogel<sup>e</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology and Parasitology; and Department of Small Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Morphological Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>d</sup> Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>e</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>f</sup> Department of Veterinary Pathology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>g</sup> Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

\*Corresponding authors: tonin\_alexandre@yahoo.com.br (A.A. Tonin);  
aleksandro\_ss@yahoo.com.br (A.S. Da Silva)

## Abstract

The aim of this study was to assess the purine levels and E-ADA activity in the brain of mice (*BALB/c*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. In experiment I (n=24) the mice were infected with RH strain of *T. gondii*, while in experiment II (n=36) they were infected with strain Me-49 of *T. gondii*. Our results showed that, for RH strain (acute phase), an increase in both periods in the levels of ATP, ADP, AMP, adenosine, hypoxanthine, xanthine (only on day 6 PI) and uric acid (only on day 6 PI). By the other hand, the RH strain led, on days 4 and 6 PI, to a reduction in the concentration of inosine. ME-49, a cystogenic strain, showed some differences in acute and chronic phase, since on day 6 PI the levels of ATP and ADP were increased, while on day 30 these same nucleotides were reduced. On day 60 PI, ME-49 induced a reduction in the levels of ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and xanthine, while uric acid was increased. A decrease of E-ADA activity was observed in brain on days 4 and 6 PI (RH), and 30 PI (Me-49); however on day 60 PI E-ADA activity was increased for infection by Me-49 strain. Therefore, it was possible to conclude that infection with *T. gondii* changes the purine levels and the activity of E-ADA in brain, which may be associated with neurological signs commonly observed in this disease.

**Keywords:** toxoplasmosis; purinergic signaling; ectoenzymes; RH; Me-49.

## 1. Introduction

Toxoplasmosis is a zoonosis of worldwide distribution, caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan parasite that infects a wide range of mammals and birds (Dubey, 2010). Oocysts, tachyzoites and bradyzoites are part of the complex biological cycle in this parasite, where sexual reproduction occurs only in felines and results in generation of oocysts that shed to the environment by contaminated feces. The oocysts may be ingested by intermediate hosts (e.g., humans, ruminants, equines) leading to the asexual reproduction of *T.*

*gondii* (Dubey, 2010; Innes, 2010; Gatkowska et al., 2012). The intermediate hosts are the most affected by toxoplasmosis, with reports of reproductive disorders and abortion in small ruminants, blindness and fetal death in humans, and behavioral and neurological disorders in different species of mammals, among other clinical signs (Monteiro, 2011; Gatkowska et al., 2012).

Toxoplasmosis can cause encephalitis, with the presence of the parasite in the central nervous system (CNS), and behavioral alterations (Silva et al., 2010; Gatkowska et al., 2012). In infected animals, encephalitis is related to inflammatory cell tissue, as well as cellular injury resulting from inflammation (Ferguson and Hutchison, 1987; Carruthers and Suzuki, 2007). The behavioral alterations may be related to changes in the concentrations of neurotransmitters in the brain, such as dopamine (Skallová et al., 2006; Prandovszky et al., 2011). Therefore, molecules of purinergic system may be affected in animals with toxoplasmosis, especially considering that *T. gondii*, like other Apicomplexa, needs host purines, such as adenosine as it cannot synthesize its own (Schwartzman and Pfefferkorn, 1982). Two purine salvage pathways have been identified in *T. gondii*, involving the enzymes hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenosine kinase (AK), that is 10-fold higher than other purine salvage enzymes (Chaudhary et al., 2004).

Basically, the purinergic system consists of nucleotide and nucleoside, receptors, and enzymes that control the concentration of purines, which play different vital functions in mammals (Sneddon et al., 1999; Burnstock, 2006; Desrosiers et al., 2007). Generally, the purinergic complete cascade is initiated by ATP hydrolysis and ends with the final product uric acid. ADP, AMP, adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid are intermediate products that also participate in this cascade. Among the purines, the ATP is a well known neurotransmitter, as well as adenosine is considered as an important CNS



modulator in mammals (Ralevic and Burnstock, 1998; Rathbone et al., 1999; Sitkovsky and Ohta, 2005; Sneddon et al., 1999; Burnstock, 2006; Desrosiers et al., 2007).

The concentration of extracellular adenosine is regulated by the activity of a small group of important enzymes including ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC: 3.5.4.4), which catalyses the conversion of the adenosine into its inactive metabolite inosine. E-ADA activity is widely distributed in tissues and body fluids of vertebrate animals in isoforms of E-ADA1 (predominantly in tissue) and E-ADA2 (found in fluids and cells). A heterogeneous expression of E-ADA activity can be found among peripheral tissues and even within the CNS (Franco et al., 1986, 1997). In toxoplasmosis, adenosine is the preferred source of purines for *T. gondii* (Krug et al., 1989), suggesting that host-derived adenosine plays an important role in *T. gondii* pathogenesis (Mahamed et al., 2012).

Changes in neurotransmitters levels may be a mechanism of behavioral alteration present in mammals with toxoplasmosis (Skallová et al., 2006; Prandovszky et al., 2011). Therefore, the aim of this study was to investigate the levels of purines and E-ADA activity in brain of mice experimentally infected with two strains of *T. gondii*.

## **2. Material and Methods**

Sixty mice (BALB/c) were divided into two experiments: Experiment I and Experiment II. This division was necessary to study two strains of *T. gondii*: RH (virulent), and Me-49 (forming strain - cystogenic), assessing their own characteristics.

### **2.1. Experiment I**

*T. gondii* strain RH (Sabin, 1941) was used to inoculate one mouse (BALB/c) intraperitoneally. Peritoneal fluid containing tachyzoites was collected after five days of infection and inoculated in another mouse. This procedure was performed in order to

reactivate the virulence of the parasite, since this strain is kept frozen into the laboratorial environment.

Twenty-four male mice, 70 days-old with an average body weight of 24.1 ( $\pm$  1.9 g) were kept in cages, housed in an experimental room with controlled temperature and humidity (25°C; 70%). They were fed with commercial feed and received water *ad libitum*. All rodents were submitted to a period of 12 days for acclimatization, being considered as clinically healthy in the beginning of experiment. After this period, the mice were divided into two groups with 12 animals each, as follow: group A (uninfected) and group B (intraperitoneally infected with 0.2 mL of peritoneal fluid containing  $1.32 \times 10^7$  tachyzoites/mL). Later, the groups were divided into two subgroups, each one with six mice, in order to evaluate two periods post-inoculation (day 4 - Group A1 and B1; day 6 - Group A2 and B2). The groups were checked daily for clinical signs of the disease.

At these periods mentioned above, the animals were anesthetized with isoflurane, submitted to cervical dislocation, and then decapitated for brain collection. Brains were weighed and divided into two hemispheres. The right hemisphere of animals of each group was used for purine assessment (n=4) and histology evaluation (n=2), while the left hemisphere (n=6) was used to analysis of E-ADA activity.

## **2.2. Experiment II**

*T. gondii*, strain Me-49, was used to inoculate intraperitoneally two mice (BALB/c). Thirty days later these animals were euthanized and their brains were collected and homogenized in saline solution. Cysts with bradyzoites were collected and inoculated orally in other two mice. This procedure was carried out in order to reactivate parasite virulence. Thirty-five days later, these mice were euthanized for collection of brain, in order to be used for inoculation of the animals of experiment II.

Thirty six male mice, 80 days-old with an average body weight of 23.9 ( $\pm$  2.4 g) were kept in the same environment and conditions mentioned above. Also, they were divided in groups of 18 animals each, as follow: group C (uninfected); group D (orally inoculated with 0.25 mL of brain homogenate/50 cysts with bradyzoites of *T. gondii* Me-49 strain). The number of parasites was estimated by optical microscope. Animals were checked daily for clinical signs of the disease.

Each group was divided into three subgroups, each one with six mice, in order to evaluate two periods (Day 6 PI – D1; day 30 PI - D2; day 60 PI - D3). Animals were anesthetized with isoflurane, submitted to cervical dislocation and after decapitation, brains were weighed and divided into two hemispheres. The right hemisphere of animals of each group was used for purine assessment (n=4) and histology evaluation (n=2), while the left hemisphere (n=6) was used to analysis of E-ADA activity.

### **2.3. Sample preparation: Experiment I and II**

The right hemisphere of four animals of each group was used to assess the concentration of purines. HPLC method is sensitive and accurate, allowing the employment of only four animals per group. Brain adenine nucleotides were extracted according to Ryder (1985). Briefly, different amounts of brain were weighted and homogenized with 0.6 M perchloric acid at 0°C for 1 min with an Ultra-turrax homogenizer (model T 18, IKA® Works Inc., Wilmington, Del., U.S.A.). The homogenate was centrifuged at 2000×g for 10 min, and the supernatant was immediately adjusted to pH 6.5 to 6.8 with 1M potassium hydroxide.

Left hemispheres of brains were weighed, homogenized in 10 volumes of 50 mmol/L per mM of phosphate buffer (pH 7.0), centrifuged for 30 min at 14,000g at 4 °C. The supernatant was then collected to analysis.

### **2.3.1. Analysis of purine levels in the brain**

Aliquots of 20  $\mu\text{L}$  of samples were applied to a reversed-phase performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu, Japan) using a  $\text{C}_{18}$  column (Ultra C18, 25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5 $\mu\text{m}$ , Restek - USA). The elution was carried out applying a linear gradient from 100% of solvent A (60 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 5 mM of tetrabutylammonium phosphate, pH 6.0) to 100% of solvent B (solvent A plus 30% methanol) over a 30 min period (flow rate at 1.4 mL/min) according to a method previously described (Voelter et al., 1980). The amounts of purines were measured by absorption at 260 nm. The retention time of standards was used as parameter for identification and quantification. Purines concentrations were expressed as nmol of different compounds per g of tissue.

### **2.3.2. E-ADA activity in brain**

E-ADA activities were estimated spectrophotometrically by the method of Giusti (1974), which is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when the enzyme acts on adenosine. The reaction was started by addition of the substrate (adenosine) to a final concentration of 21 mmol/l and incubation carried out for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The volume of 25  $\mu\text{L}$  of the brain homogenates (left hemisphere) were used. The enzymatic reaction was started by addition of 500  $\mu\text{l}$  of 21 mM adenosine as substrate. The reaction was stopped by adding 1.5 ml of 106/0.16 mM phenol–nitroprusside to the reaction mixture, which was immediately mixed with 1.5 ml of 125/11 mM alkaline-hypochloride (sodium hypochlorite). The ammonia released would react with alkaline-hypochlorite and phenol in the presence of a catalyst-sodium nitroprusside to produce indophenol (a blue color) and the concentration of ammonia is directly proportional to the absorbance of indophenol read at 620 nm. Ammonium sulphate of 75 IM was used as ammonium standard.

Protein concentration of the brain homogenate was measured by the method of Peterson (1977) with bovine serum albumin used as a standard. The value of E-ADA activity in the brain tissue was expressed as U/mg of protein.

## **2.4. Histopathology**

### **2.4.1. RH strain**

Brain tissues from four infected mice and four uninfected (two of each period - days 4 and 6 PI) were collected, stored in 10% formalin buffered solution. Sagittal sections of every 3 mm were obtained and stained with hematoxylin and eosin.

### **2.4.2. Me-49 strain**

Right hemispheres from six mice [Me – 49 (days 6, 30 and 60 PI)], along with six uninfected mice (two in each period) were collected and stored in 10% formalin buffered solution. Sagittal sections of every 3 mm were obtained and stained with hematoxylin and eosin.

## **2.5. Statistical analysis**

The results were compared between uninfected and infected animals for each strain of *T. gondii*. There was no comparison between strains of *T. gondii*. The data were summarized as means and standard deviations and were analyzed by the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## **3. Results**

### **3.1. Purine levels in brain**

**RH strain:** results of infected mice are shown in Figure 1. Infected animals statistically differed from healthy mice in almost all the molecules and analyzed days, with exception of

levels of xanthine and uric acid on day 4 PI which remained equal. In infected mice it was verified a significant ( $P<0.05$ ) increase in the levels of ATP, ADP, AMP, adenosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid in the brain (Fig. 1). Inosine significantly ( $P<0.05$ ) reduced in infected mice, when compared to uninfected ones (Fig. 1).

**Me-49 strain:** Results are shown in Figure 2. On day 6 PI, it was observed an increase in the levels of ATP ( $P<0.05$ ) and ADP ( $P<0.01$ ) (Fig. 2-A), while on day 30 PI a significant ( $P<0.01$ ) decrease in brain levels of the same nucleotides (ATP and ADP) was observed (Fig. 2-B). In contrast, no statistical difference was found between groups regarding other purines on days 6 and 30 PI ( $P>0.05$ ). However, concentrations of AMP, adenosine, inosine, hypoxantina, xanthine and uric acid did not show statistical differences between groups ( $P>0.05$ ). Nevertheless, on day 60 PI, the animals infected with ME-49 showed a significant reduction in the levels of ATP ( $P<0.01$ ), ADP ( $P<0.05$ ), AMP ( $P<0.05$ ), adenosine ( $P<0.01$ ), inosine ( $P<0.01$ ), and xanthine ( $P<0.05$ ). However, uric acid significantly increased ( $P<0.01$ ) (Fig. 2-C), while hypoxanthine levels did not differ between groups ( $P>0.05$ ).

### **3.2. E-ADA in brain**

The results of E-ADA activity are presented in Figure 3. E-ADA activity was reduced in mice infected with the RH strain (days 4 and 6 PI), as well as in mice infected with the ME-49 strain (day 30 PI). On day 6 PI (Me-49 strain) was not observed difference between groups in the E-ADA activity ( $P>0.05$ ). However, along with the evolution of the disease, mice infected with the ME-49 strain showed an increase of E-ADA activity at day 60 PI.

### 3.3. Histology

Uninfected group did not present histological changes (Fig. 4-A), results similar to those observed in mice infected with RH strain on days 4 and 6 PI, as well as for ME-49 strain on day 6PI. However, on day 30 PI, mice infected with Me-49 strain showed mild inflammatory infiltrate (without the presence of cysts), with mononuclear cell infiltration (Fig. 4-B), consisting predominantly of lymphocytes and plasma cells, as well as some macrophages and neutrophils in the meninges and Virchow-Robin spaces. The two animals infected with Me-49 analyzed on day 60 PI, showed the same histology lesions with presence of cell infiltration (Fig. 4-C) and parasitic cysts (Fig. 4-D) measuring about 30 to 40  $\mu\text{m}$  in diameter and filled with bradyzoites. Identical cysts were seen in the cerebellum. In the brainstem, the inflammatory infiltrate was similar to that described for telencephalon; however, much more pronounced, especially in relation to the meninges. At this location there was a greater amount of bradyzoites, filling up the cysts, when compared to telencephalon and cerebellum.

## 4. Discussion

Researchers already reported alterations in the concentration of dopamine, serotonin and noradrenalin in the brain of mice infected with *T. gondii*, suggesting that these alterations may be related to behavioral change in animals with toxoplasmosis (Gatkowska et al., 2013). Therefore, the changes in purines levels observed in this study may also contribute for the clinical and neurological signs described, as well as to the behavioral changes observed in intermediate hosts with toxoplasmosis (Silva et al., 2010; Monteiro, 2011; Gatkowska et al., 2012).

In Experiment I, during the acute phase, mice infected with *T. gondii* (RH strain) showed increased levels of purines in brain, with an exception for inosine concentration

which was decreased when compared to healthy animals. These changes are strongly supported by the scientific literature. Firstly, the increased ATP levels may be related to the inflammatory response and neurotoxicity, since it is an important neurotransmitter (Edwards et al., 1992; Agresti et al., 2005). The elevation of ATP levels promotes increased levels of intracellular calcium mediated by P2X receptors, and this event could cause a significant damage to the cells (Edwards et al., 1992), contributing to nervous disorders and behavioral alterations in mice with toxoplasmosis, as already reported by Gatkowska et al. (2012). ATP could lead to an excitotoxicity response by excitatory neurotransmitters release, such as glutamate (Lima et al., 2007).

In another front, according to researchers, *T. gondii* is sensitive to the action of extracellular ATP (Correa et al., 2010), since ATP is known as an activator of other inflammatory mediators against infectious diseases (Bours et al., 2006). In the CNS, control of *T. gondii* infection is mediated by infiltrating leukocytes, particularly cytotoxic T lymphocytes that activate parasitocidal and parasitistatic mechanisms in infected cells (Sher et al, 1995; Däubene and Hadding, 1997; Deussen et al, 1999; Wang et al, 2004); and therefore, depending on pro-inflammatory actions. Based on our results, we believed that RH strain infection elicited the increase of extracellular levels of ATP during the acute phase (pro-inflammatory action), promoting, consequently, the nucleotide-hydrolysing initiating by the hydrolysis of ATP by E-NTPDase (CD39), leading to the subsequent increase of ADP, AMP and adenosine levels in the brain.

In the Experiment II, when the cystogenic strain (Me-49) was evaluated during the acute phase of the infection (day 6 PI), similar results were observed in relation to the virulent strain (Experiment I - RH). Initially an increase in the levels of ATP and ADP was observed and, as mentioned before, ATP is an important neurotransmitter that, when in high concentrations, collaborates to pro-inflammatory actions (Edwards et al., 1992; Agresti et al.,



2005), as well as *T. gondii* is sensitive to the action of extracellular ATP (Correa et al., 2010). The increase in ADP levels, probably was due to the extensive hydrolysis of ATP (which was firstly increased), since there was clear evidence of ADP functionalities in SNC. By the other hand, a reduction was observed in the purines concentration on days 30 (ATP and ADP) and 60 PI (ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and xanthine), with an exception of uric acid in Me-49 strain that increased on day 60 PI. Mice infected with the strain Me- 49 showed less pronounced histological lesions on day 30 PI than on day 60 PI. It was possible to observe a clear difference in size of the lesion, especially in inflammatory infiltrates, may representing the differences observed in the purine levels assessed in the brain tissue of these animals. According to researches, histological lesions interfere with the neurochemical concentrations, neurotransmission and neuromodulators in brain, which can represents a toxic imbalance for nerve cells (Burnstock, 2006; Arbeloa et al., 2012).

The reduction in ATP levels, one important neurotransmitter, may interfere with the nerve synapse, and thus, causes the previously described behavioral alterations in mice experimentally infected (Gatkowska et al., 2012). Histological lesions associated with inflammatory infiltrates and parasitic cysts were observed in brain of animals infected with the cystogenic strains, probably directly related to the reduced level of ATP. Studies in cell culture show that when there is a largest decline in the percent of viable astrocytes during ischemia, occurs a concomitant reduction in ATP and ADP levels (Yu et al., 2002). Our first hypothesis lies on the fact that although *T. gondii* can synthesize pyrimidines *de novo*, it lacks the ability to synthesize purines, including adenosine (Schwartzman and Pfefferkorn, 1982). The parasite then, uses the host purines, especially when CD73 (5' nucleotidase) mediates the final rate-limiting step in the enzymatic chain that catalyzes the dephosphorylation of extracellular AMP to adenosine from ATP. Thus, it is possible that this purines reduction was linked to their consumption by the parasites.

Another possibility, is that ATP may have increased during the acute phase of the infection with Me-49 strain in order to stimulate inflammatory mediators (especially the cytokines), probably leading to a direct killing of intracellular pathogens (Jamieson et al., 2010), similar to what occurred in the RH strain. However, it is known that, concomitant with the inflammation, there is a production of molecules with neurotoxic potential to the cells, and thus, increasing the toxicity to the nerve cells and, consequently, reducing the levels of ATP. Thus, a reduction of ATP is directly related to the reduction in the levels of ADP, AMP, adenosine and inosine in the brain. There are no clear evidences of functions performed by ADP and AMP in CNS, but it was evident that both were influenced by *T. gondii*.

Adenosine actively participates in the immune response, representing a molecule of anti-inflammatory and an anti-platelet properties, besides its action as a CNS modulator (Cunha and Ribeiro, 2000; Cunha, 2001; Kumar and Sharma, 2009). Therefore, the increase of adenosine in mice infected with *T. gondii* (RH strain) probably had a protective role by modulating the release of neurotransmitters. It was already reported that the infection by *T. gondii* causes a significant reduction in the E-ADA activity in the brain of mice (Gherardi et al. 1999), as well as report an increase of E-ADA activity on lymphocytes of infected rats by *T. gondii* (Tonin et al., 2013). Our results reinforce these studies, since we observed reduction in E-ADA activity on days 4 and 6 (RH strain), and 30 (Me-49). By the other hand, as mentioned before, *T. gondii* lacks the ability to synthesize purines, including adenosine (Schwartzman and Pfefferkorn, 1982). High levels of adenosine in the extracellular space (such as the adenosine levels on days 4 and 6 PI for RH strain, in our work) trigger its transport into cells by means of transporters (Deussen et al., 1999). The transport of adenosine across cell membranes is the first step in the salvage of adenosine by *T. gondii* (Schwab et al., 1995; Chiang et al., 1999; De Koning et al., 2003). Therefore, the increased levels of extracellular adenosine probably helped in the establishment of the parasitism, contributing to

the effective *T. gondii* pathogenesis of RH strain in our study. Considering the results obtained for the ME-49 strain, the levels of ADO were statistically lower only on day 60 PI. According to Mahamed et al. (2012), it is possible that, under conditions in which extracellular adenosine levels are diminished or absent such as in mice or cells lacking CD73, there would be an overall deficit in the availability of adequate sources of adenosine. Such a deficit can have an impact on *T. gondii* is ability to undergo efficient transformation to the bradyzoite or long-lived cyst stage (Mahamed et al., 2012). We believed, that the reduced adenosine levels on day 60 PI was more related to the increased E-ADA activity at this period. Adenosine, besides all the other functions, also plays a regulatory role in neuronal activity and has neuroprotective actions in P1 purinoreceptor-mediated pathological condition (Cunha and Ribeiro, 2000; Cunha, 2001). As a result, we suggest that the low levels of adenosine may contribute to the behavioral changes observed, as reported recently in mice infected with *T. gondii* (Gatkowska et al., 2012), as well as to the constitution of the inflammatory process as observed in our results of histology, especially on day 60 PI.

Inosine was already considered an inert molecule; however it has been recognized as a molecule able to bind to receptors for adenosine, performing similar functions in pathological situations (Hasko and Cronstein, 2004, Fredholm et al., 2011). Studies show that inosine has potent immunomodulatory and neuroprotective effects (Hasko et al., 2000; Hasko et al., 2004; Nascimento et al., 2010). Since we found reduction in the inosine levels in the brain of mice with toxoplasmosis (RH, and Me-49 strains), it may also contribute to the pathogenesis of neurological disorders as was described in mice infected by this parasite.

The oxidation of hypoxanthine and xanthine catalyzed by xanthine oxidase produce uric acid, a potent antioxidant (Santos et al., 1999). The high levels of these purines is a defense mechanism to oxidative stress caused by toxoplasmosis (Engin et al., 2012) associated with inhibition of the enzyme xanthine oxidase already reported in mice infected

with *T. gondii* (Gherardi et al., 1999). In Experiment I, there was an increase of hypoxanthine and xanthine in infected mice, different from what occurred in Experiment II, when the brain concentration of these purines decreased considerably. These changes in both studies appear to be related to purinergic cascade initiated by ATP, which differed according to the strain investigated.

Uric acid has been considered to be an efficient scavenger of peroxynitrite (Santos et al., 1999) and increases of NO $\cdot$  has been already described in hosts with toxoplasmosis (Hayashi et al., 1996; Rosenfeld et al., 2005). Probably, the increase in the concentration of uric acid observed in the present study (for RH and Me-49 strains) served as a mechanism of neuroprotection against oxidative stress mediated by *T. gondii* due to its antioxidant property.

Based on these results, we can conclude that the two strains of *T. gondii*, as well as the evolution time of the disease interferes with the purines concentration and E-ADA activity in brain of mice experimentally infected with different strains, as well as in the degree of histological lesions in brain. During the acute toxoplasmosis (RH infection) occurred an increase in purines (ATP, ADP, AMP, adenosine, xanthine, hypoxanthine and uric acid), and a reduction of inosine concentration, although the mice did not exhibit histological lesion. However, the cytogenetic strain (Me-49) caused histological lesions in brain tissue, as well as led to a reduction in the levels of some purines (ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, xanthine and hypoxanthine), followed by increases in the concentration of the antioxidant, uric acid, in chronic toxoplasmosis. The E-ADA activity is directly related to the concentration of adenosine in the CNS. These alterations may influence the pathogenesis of *T. gondii* infection.

## References

- Arbeloa, J., Pérez-Samartín, A., Gottlieb, M., and Matute, C. 2012. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiology Disease* 45, 954–961
- Agresti, C., Meomartini, M.E., Amadio, S., Ambrosini, E., Serafini, B., and Franchini, L. 2005. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Research* 48, 157–165.
- Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. 2006. Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology Therapy* 112, 358- 404.
- Burnstock, G. 2006. Purinergic signaling – an overview. *Novartis Found Symposium* 276, 26–48.
- Carruthers, V.B., and Suzuki, Y. 2007. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull* 33, 745–751.
- Chaudhary, K., Darling, J.A., Fohl, L.M., Sullivan, W.J. Jr., Donald, R.G., Pfefferkorn, E.R., Ullman, B., Roos, D.S. 2004. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 31221–31227.
- Chiang, C.W., Carter, N., Sullivan, W.J. Jr., Donald R.G., Roos, D.S., Naquib, F.N., el Kouni, M.H., Ullman, B., Wilson, C.M., 1999. The adenosine transporter of *Toxoplasma gondii*. Identification by insertional mutagenesis, cloning, and recombinant expression. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 35255–35261.
- Correa, G., Silva, C.M., Moreira-Souza, A.C.A., Vommaro, R.C., Coutinho-Silva, R. 2010. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbial and Infection* 12, 497-504.
- Cunha, R.A., Ribeiro, J.A. 2000. ATP as presynaptic modulator. *Life Science* 68, 119–137.

- Cunha, R.A. 2001. Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. *Neurochemistry International* 38, 107–125.
- Däubener, W., Hadding, U. 1997. Cellular immune reactions directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the central nervous system. *Medical Microbiology and Immunology* 185, 195–206.
- De Koning, H.P., Al-Salabi, M.I., Cohen, A.M., Coombs, G.H., Wastling, J.M. 2003. Identification and characterisation of high affinity nucleoside and nucleobase transporters in *Toxoplasma gondii*. *The International Journal for Parasitology* 33, 821–831.
- Desrosiers, M.D., Katherine, M.C., Fakir, M.J., Stephens, L.A., Jama, F.M., Shameli, A., Mehal, W.Z., Santamaria, P., and Shi, Y. 2007. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *Journal of Immunology* 179, 1884–1892.
- Deussen, A., Stappert, M., Schäfer, S., Kelm, M. 1999. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: Understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99, 2041–2047.
- Dubey, J.P. 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313p.
- Engin, A.B., Dogruman-Al, F., Ercin, U., Celebi, B., Babur, C., and Bukan, N. 2012. Oxidative stress and tryptophan degradation pattern of acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitology Research* 111, 1725–1730.
- Edwards, F.A., Gibb, A.J., and Colquhoun, D. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144–147.
- Ferguson, D.J., and Hutchison, W.M. 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitology Research* 73, 483–491.

- Franco, R., Canela, E.I., and Bozal, J. 1986. Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. *Neurochemical Research* 11, 423–435.
- Franco, R., Casado, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E.I., Llois, C. 1997. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress of Neurobiology* 52, 283–294.
- Fredholm, B.B., Jacobson, K.A., Linden, J., and Muller, C.E. 2011. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacology Review* 63, 1-34.
- Gatkowska, J., Dziadek, B., Dzitko, K., Dlugonska, H., and Wieczorek, M. 2012. Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. *Parasitology Research* 111, 53–58.
- Gatkowska, J., Wieczorek, M., Dziadek, B., Dzitko, K., and Dlugonska, H. 2013. Sex-dependent neurotransmitter level changes in brains of *Toxoplasma gondii* infected mice. *Experimental Parasitology* 133, 1-7.
- Gherardi, A., Sarciron, M.E., Francoise, A., Peyron, F. 1999. Purine pathway enzymes in a cyst forming strain of *Toxoplasma gondii*. *Life Sci* 65, 1733-1738.
- Giusti, G. 1974. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp. 1092–1099.
- Hasko, G., Kuhel, D.G., Németh, Z.H., Mabley, J.G., Stachlewitz, R.F., Virág, L., Lohinai, Z., Southan, G.J., Salzman, A.L., and Szabó, C. 2000. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *Journal of Immunology* 164, 1013–1019.
- Hasko, G., Cronstein, B.N. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunology* 25, 33-39.

- Hasko, G., Sitkovsky, M.V., and Szabo, C. 2004. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacology Science* 25, 152-157.
- Hayashi, S., Chan, C.C., Gazzinelli, R., and Roberge, F.G. 1996. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *Journal of Immunology* 156, 1476–1481.
- Innes, E.A. 2010. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoo Pub Health* 57, 1-7.
- Jamieson, S.E., Peixoto-Rangel, A.L., Hargrave, A.C., Roubaix, L.A.D., Mui, E.J., Boulter, N.R., Miller, E.N. 2010 Evidence for associations between the purinergic receptor P2X 7 (P2RX7) and toxoplasmosis. *Genes and Immunity* 11, 374-383.
- Krug, E.C., Marr, J.J., Berens, R.L. 1989. Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 10601–10607.
- Kumar, V., and Sharma, A. 2009. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European Journal of Pharmacology* 616, 7–15.
- Lima, R.R., Costa, A.M.R., De Souza, R.D., Gosmes-Leal, W. 2007. Degeneração neuronal secundária e excitotoxicidade. *Revista Paranaense Medicina* 21, 27–31.
- Mahamed, D.A., Mills, J.H., Egan, E.E., Denkers, E.Y., Bynoe, M.S. 2012. CD73-generated adenosine facilitates *Toxoplasma gondii* differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 109, 16312–16317.
- Monteiro, S.G. 2011. *Parasitologia na Medicina veterinária*. Roca, Rio de Janeiro, 356p.
- Nascimento, F.P., Figueredo, S.M., Marcon, R., Martins, D.F., Macedo, S.J. Jr, Lima, D.A., Almeida, R.C., Ostroski, R.M., Rodrigues, A.L., and Santos, A.R. 2010. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *Journal Pharmacology and Experimental Therapy* 334, 590-598.



- Peterson, G.L. 1977. Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83, 346–356.
- Prandovszky, E., Gaskell, E., Martin, H., Dubey, J.P., Webster, J.P., McConkey, G.A. 2011. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PLoS One* 6, e23866.
- Ralevic, V., and Burnstock, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacology Research* 50, 413–492.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A.R., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F. 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress of Neurobiology* 59, 663–690.
- Ryder, J.M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish products by high-performance liquid chromatography. *Journal Agriculture Food Chemistry* 33, 678–680.
- Rosenfeld, C., Martinez, R., Seabra, S., Sant'Anna, C., and Gonçalves, J.G.R. 2005. *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon- $\gamma$ -activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor- $\beta$ 1 production by infected microglia. *American Journal of Pathology* 167, 1021–1031.
- Sabin, A.B. 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 116, 801–807.
- Santos, C.X., Anjos, E.I., Augusto, O. 1999. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 372, 285-294.
- Schwartzman, J.D., Pfefferkorn, E.R. 1982. *Toxoplasma gondii*: Purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Experimental Parasitology* 53, 77–86.

- Schwab, J.C., Afifi Afifi, M., Pizzorno, G., Handschumacher, R.E., Joiner, K.A. 1995. *Toxoplasma gondii* tachyzoites possess an unusual plasma membrane adenosine transporter. *Molecular and Biochemical Parasitology* 70, 59–69.
- Sher, A., Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T. 1995. Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii*. *Ciba Foundation symposium* 195, 95–104.
- Sitkovsky, M.V., and Ohta, A. 2005. The ‘danger’ sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunology* 26, 299–304.
- Silva, N.M., Manzan, R.M., Carneiro, W.P., Milanezi, C.M., Silva, J.S., Ferro, E.A.V., and Mineo, J.R. 2010. *Toxoplasma gondii*: The severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood–brain barrier permeability. *Experimental Parasitology* 126, 167–177.
- Sneddon, P., Westfall, T.D., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, D.P., and Kennedy, C. 1999. Modulation of purinergic neurotransmission. *Progress of Brain Research* 20, 11–20.
- Skallová, A., Kodym, P., Frynta, D., Flegr, J. 2006. The role of dopamine in *Toxoplasma*-induced behavioural alterations in mice: an ethological and ethopharmacological study. *Parasitology* 133, 525–535.
- Tonin, A.A., Da Silva, A.S., Ruchel, J.B., Rezer, J.F.P., Camillo, G., Faccio, L., França, R.T., Leal, D.B.R., Duarte, M.M.M.F., Vogel, F.F., Rue, M., Lopes, S.T.A., 2013. E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology* 135, 325–330.
- Voelter, W., Zech, K., Arnold, P., and Ludwig, G. 1980. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ionpair chromatography. *Journal of Chromatographia* 199, 345-354.

- Yu, A.C., Lau, A.M., Fu, A.W., Lau, L.T., Lam, P.Y., Chen, X.Q., Xu, Z.Y. 2002. Changes of ATP and ADP in cultured astrocytes under and after in vitro ischemia. *Neurochemistry Research* 27, 1663-1668.
- Wang, X., Kang, H., Kikuchi, T., Suzuki, Y. 2004. Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. *Infection and Immunity* 72, 4432–4438.

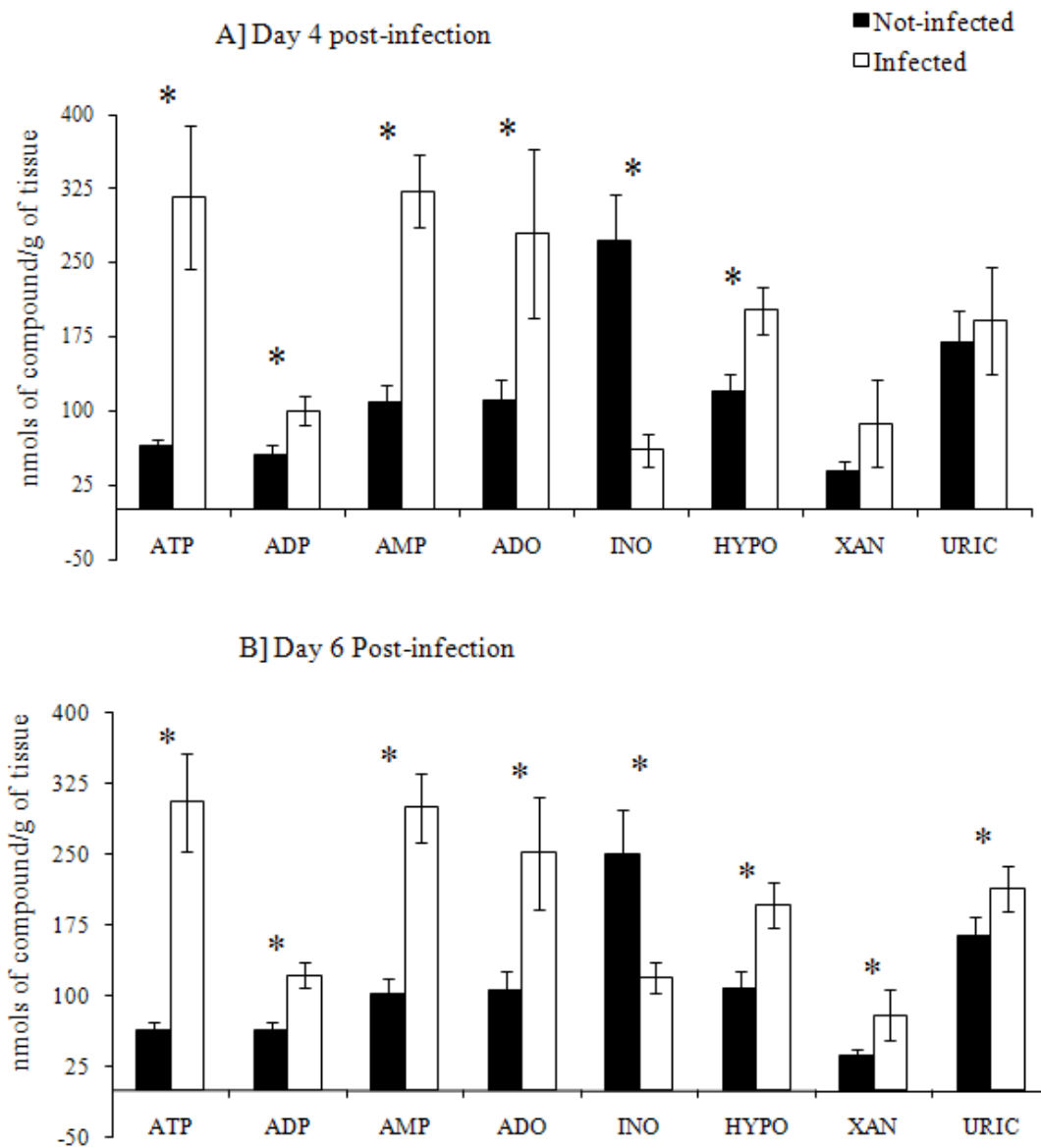


Figure 1: Mice infected with RH strain of *Toxoplasma gondii* (Group B) compared not-infected (Group A) on days 4 (A1 (n=4) and B1 (n=4)) and 6 (A2 (n=4) and B2 (n=4)) post-infection. Levels of purines in brain (right hemisphere): adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), adenosine (ADO), inosine (INO), hypoxanthine (HYPO), xanthine (XAN) and uric acid (URIC) (\*P<0.01).

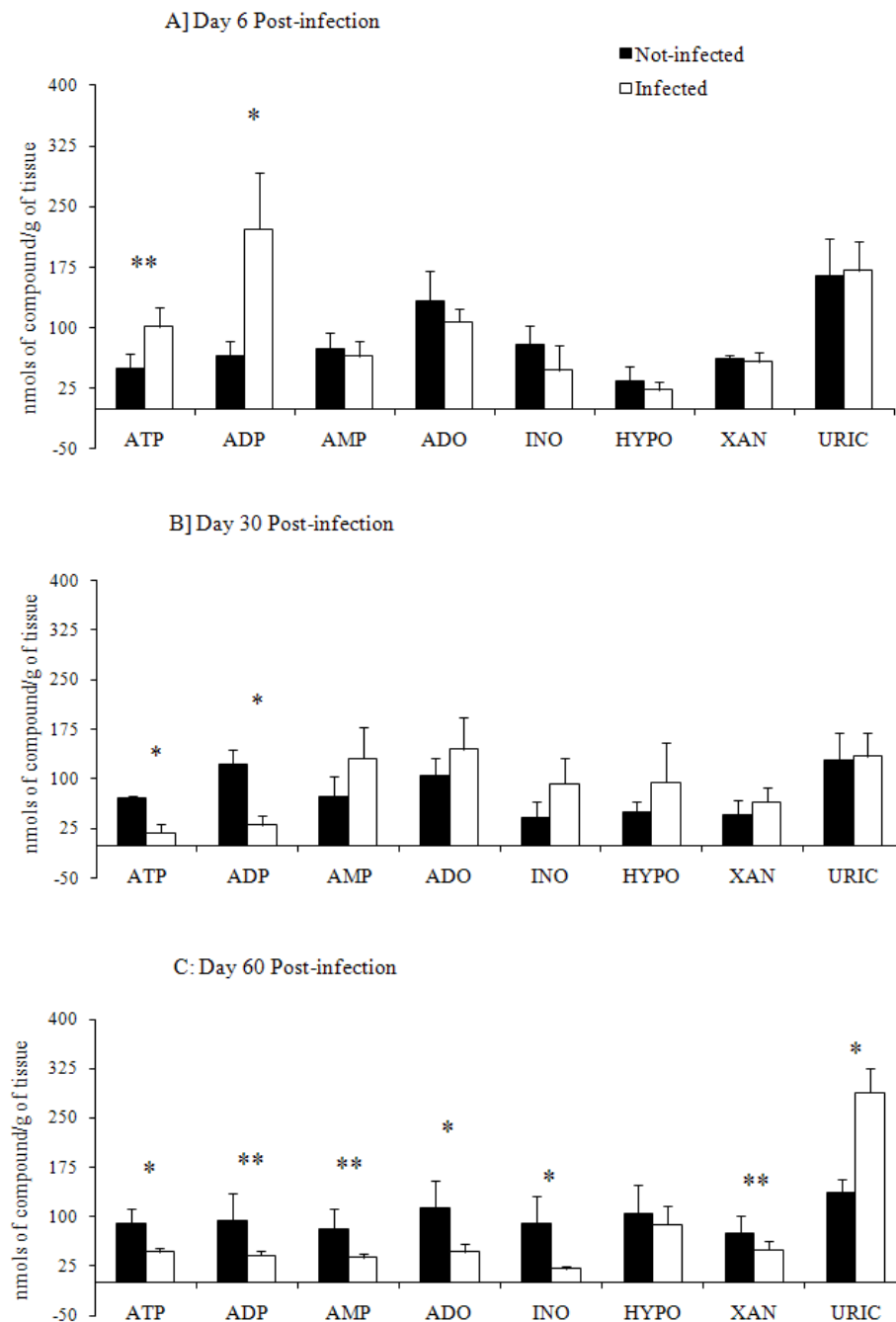


Figure 2: Mice infected by Me-49 strain of *Toxoplasma gondii* (Group D) compared not-infected (Group C) on days 6 (C1 (n=4) and D1 (n=4)), 30 ((C2 (n=4) and D2 (n=4))) and 60 ((C3 (n=4) and D3 (n=4))) post-infection. Levels of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), adenosine (ADO), inosine (INO), hypoxanthine (HYPO), xanthine (XAN) and uric acid (URIC) in brain (right hemisphere) was measured (\*P<0.01; \*\*P<0.05).

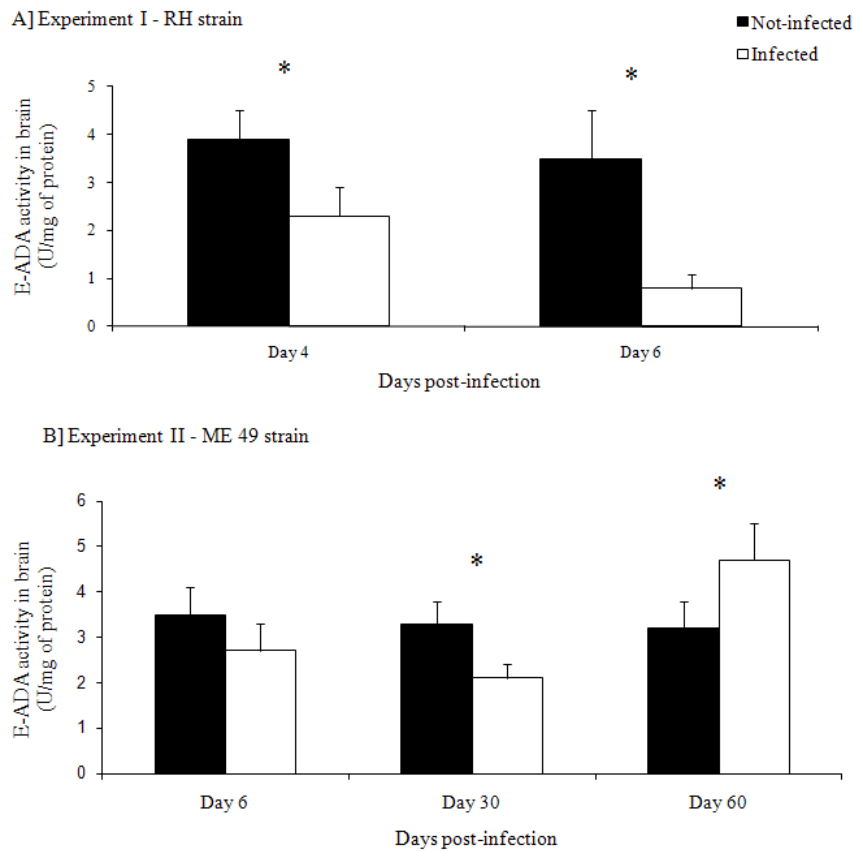


Figure 3: Mice experimentally infected by *Toxoplasma gondii* (Total 36 animals; n=6 per subgroup). E-ADA activity in brain (left hemisphere) of infected mice compared to not-infected (control) for strains RH (A), on days 4 and 6 PI; and Me-49 (B), on days 6, 30 and 60 PI. Asterisks indicate statistical difference (\* $P < 0.01$ ) between infected and not-infected groups.

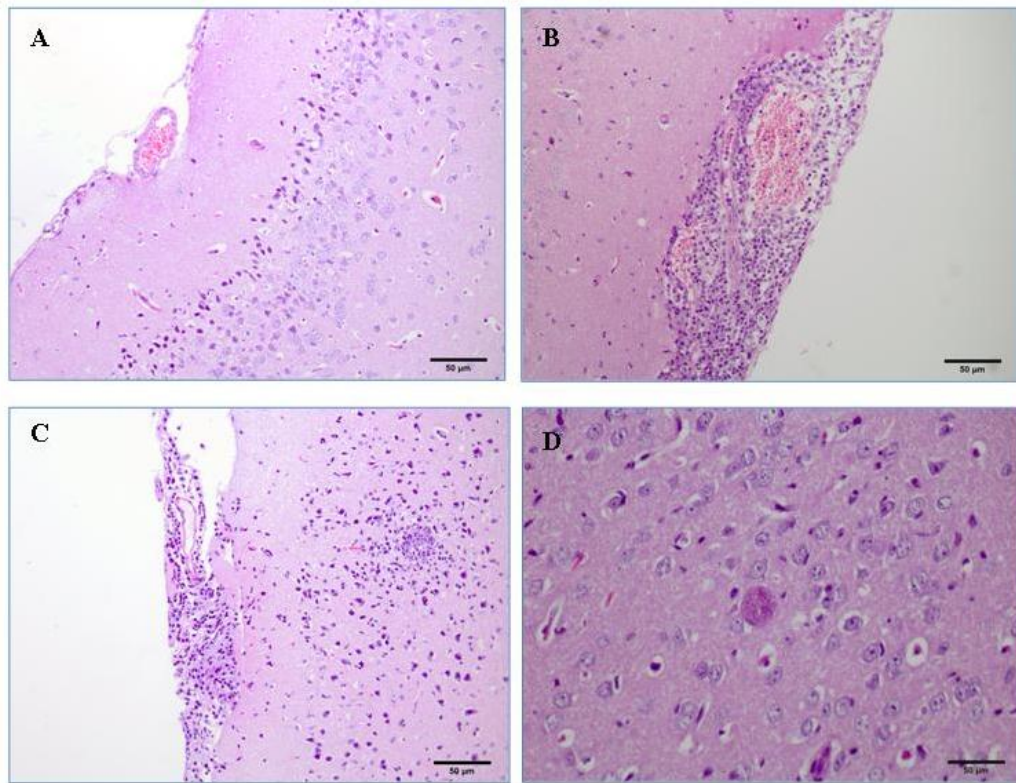


Figure 4: Brain of healthy mice, uninfected group [A]; Brain of mice infected with *Toxoplasma gondii* Me-49 strain on the 30<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> day post-infection (PI), [B and C, respectively] where is possible to observe inflammatory infiltration in animals infected with this cystogenic strain; Mice infected with Me-49 strain showing presence of cysts filled with bradyzoites [D]. NOTE: Brain of mice infected with the RH strain not was observed histological alterations.





## 6 DISCUSSÃO

Sabe-se que os mecanismos de defesa contra a toxoplasmose exercem um papel crucial no controle da infecção; e que estes mecanismos são baseados em uma imunidade protetora específica que se desenvolve através dos mecanismos humoral e, principalmente, por uma marcante resposta celular (DUBEY et al., 1998). Em se tratando de resposta imune, tanto o sistema purinérgico (BURNSTOCK, 2006), quanto o colinérgico (DAS, 2007) possuem algumas propriedades imunomodulatórias bem definidas; porém, a relação destes sistemas com algumas importantes doenças ainda tendem a ser muito exploradas em futuras pesquisas. Desta maneira, sabendo-se que uma resposta imune eficiente é vital ao hospedeiro frente a uma infecção por *T. gondii*, buscou-se avaliar a real participação dos sistemas purinérgico e colinérgico nesta enfermidade, compondo estas avaliações, os objetivos principais do projeto que originou a presente tese.

### 6.1 Avaliação enzimática periférica na toxoplasmose

Inicialmente foi avaliada a influência da infecção por *T. gondii* em um panorama sistêmico, *in vivo*, uma vez que foram utilizadas avaliações de atividades enzimáticas em células sanguíneas, principalmente nos linfócitos. Em se tratando destas respostas ao parasito geradas pelo sistema purinérgico (sinalização purinérgica), foi possível observar que tanto a E-NTPDase quanto a E-ADA tiveram suas atividades afetadas pela infecção. A E-NTPDase desempenha um importante papel no controle da função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990). Quando a atividade desta enzima foi avaliada em linfócitos de ratos Wistar, experimentalmente infectados com a cepa RH do *T. gondii*, observou-se que a atividade da E-NTPDase estava aumentada, acompanhada de uma linfocitose. O aumento na atividade dessa enzima pode surgir como um mecanismo adaptativo com a finalidade de reduzir os níveis de ATP, conferindo certo grau de proteção celular (LUNKES et al., 2004; SPANEVELLO et al., 2006; KAIZER et al., 2007). Assim, esse aumento da atividade da E-NTPDase, observado em ambos os momentos, pode indicar que a concentração extracelular

de ATP tenha sido sensivelmente diminuída. O ATP, dependendo da sua concentração e do local de ação, possui ações pró e anti-inflamatórias, de acordo da sua concentração extracelular e tipo de receptor envolvido (DI VIRGILIO, 2005; BOEYNAEMS & COMMUNI, 2006; DI VIRGILIO et al., 2009). Quando em baixas concentrações, o ATP extracelular possui afinidade por receptores do tipo P2Y, localizados na superfície dos linfócitos. Estes receptores quando estimulados promovem uma *downregulation* na expressão e liberação de citocinas próinflamatórias, estimulam uma resposta Th2, e levam à liberação de citocinas anti-inflamatórias, promovendo um efeito protetor por ser capaz de evitar, ou minimizar danos teciduais excessivos (BOURS et al., 2006). Entretanto, é preciso se considerar a participação dos mecanismos de evasão do parasito, visto que *T. gondii* é capaz de produzir e liberar E-NTPDase (BERMUDES et al., 1994), o que, talvez, também tenha contribuído para a possível redução dos níveis de ATP extracelular.

Para fortalecer a hipótese da ocorrência de uma *downregulation* protetiva do ATP, foi avaliada a atividade da E-ADA nos linfócitos, visto que a E-ADA é responsável pela regulação da concentração de adenosina (ADO) no meio extracelular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Em condições patológicas, a ADO desempenha um papel protetor, modulando a liberação de neurotransmissores e também atuando como um regulador endógeno da imunidade inata e na defesa do hospedeiro de lesão tecidual excessiva associada à inflamação (RATHBONE et al., 1999; BERAUDI et al., 2003; HASKO & CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY & OHTA, 2005; BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007), sendo considerada uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações antagônicas as do ATP (BOURS et al., 2006). Os resultados encontrados demonstraram que a atividade da E-ADA estava aumentada. Este aumento na atividade enzimática, provavelmente foi decorrente das altas concentrações de ADO, geradas em consequência da hidrólise dos nucleotídeos da cadeia purinérgica. A ADO pode atuar como um “sinalizador” fornecendo informações para o sistema imune sobre dano tecidual, principalmente em infecções agudas (KUMAR & SHARMA, 2009). Esta sinalização geralmente acontece quando a ADO estimula receptores  $A_2$  a se ligarem a proteína G, reduzindo a função efetora dos neutrófilos e linfócitos (BOURS et al., 2006). Desta maneira, a ADO em altas concentrações pode atuar via receptores purinérgicos, atenuando a inflamação e os danos teciduais. Esses resultados corroboram a hipótese de que o aumento na atividade da E-NTPDase visou proporcionar um efeito protetor celular, frente à infecção por *T. gondii*. Neste primeiro experimento, foram ainda avaliados alguns outros parâmetros visando a confirmação da infecção pelo agente, e assim, validando os resultados obtidos. Neste sentido é importante ressaltar que na avaliação

sorológica, foram observados níveis de IgM anti-*T. gondii* aumentados nos dois períodos avaliados; e níveis de IgG aumentados no dia 10 PI, caracterizando uma curva imunológica típica de um processo infeccioso.

Baseado nos resultados obtidos na avaliação sistêmica (atividade nos linfócitos) *in vivo* das enzimas do sistema purinérgico, os quais auxiliaram na validação do modelo experimental utilizado, o passo seguinte foi estabelecer o papel das enzimas do sistema colinérgico na toxoplasmose. Os resultados alcançados nessa etapa permitiram o estabelecimento de uma relação entre os dois sistemas, relativos a modulação da resposta imunológica frente à infecção pela cepa RH do *T. gondii*. Da mesma forma que na avaliação anterior, foram estabelecidos parâmetros que validassem, ou confirmassem, nesse caso, a resposta inflamatória gerada pela resposta à infecção. Nesse sentido foi optado por se dosar algumas citocinas próinflamatórias (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 e IL-6), e todas foram detectadas em concentrações estatisticamente elevadas em relação ao controle negativo, em ambos os períodos, demonstrando o padrão próinflamatório inerente à infecção. Em relação à atividade enzimática colinérgica, foi observado um aumento da AChE nos linfócitos.

A AChE possui um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica. Ela é responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor ACh, uma molécula mediadora da via colinérgica anti-inflamatória, cuja atuação se dá pela inibição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 (IL-1) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), quando esta molécula se liga à receptores nicotínicos na superfície dos linfócitos (RAMIREZ et al., 1997). A ACh também regulando os níveis da serotonina, dopamina e de outros neuropeptídeos e, portanto, modula tanto a resposta imune como a neurotransmissão (DAS, 2007). Considerando-se a elevação da atividade da AChE observada, pode-se sugerir que a ACh foi rapidamente degradada, o que favoreceria uma ação pró-inflamatória da AChE, como confirmado pelos resultados da avaliação das citocinas, mencionados acima. A BChE foi dosada em amostras de soro desses animais, porém sem apresentar alterações significativas na sua atividade. Porém, em camundongos que são mais sensíveis a toxoplasmose, já foram descritas alterações da atividade da BChE no soro e em amostras de fígado (DA SILVA et al., 2013), o que demonstra um comportamento enzimático diferente.

A diferença entre o aumento da atividade da enzima no sangue total (que ocorreu somente no dia 5 PI), em relação aos linfócitos (dias 5 e 10PI), pode ser explicada pela linfocitose observada no dia 10 PI, aliada à diminuição do número total de eritrócitos nesse mesmo período. Em relação à linfocitose, a relação é direta, visto que a ACh também é produzida no interior dos linfócitos (KAWASHIMA & FUJII, 2003), ou seja, uma linfocitose

provavelmente tenha representado uma maior quantidade de ACh liberada, gerando a necessidade de um aumento na atividade da AChE, como observado. Quanto a redução no número de eritrócitos, pode-se afirmar que estas células sanguíneas são as que possuem o maior volume de AChE na membrana (WRIGHT & PLUMMER, 1973), ou seja, a redução no número de eritrócitos provavelmente tenha acarretado na diminuição da biodisponibilidade de AChE, levando a uma menor liberação desta enzima e de suas ações sobre o substrato (ACh).

Dessa forma, analisando conjuntamente os resultados obtidos para os grupos enzimáticos avaliados em ambos os sistemas, purinérgico e colinérgico, é possível reafirmar alguns achados clássicos da toxoplasmose, bem como propor um mecanismo de modulação em resposta à infecção pelo *T. gondii*. Em relação aos achados clássicos, sabe-se que anticorpos contra o parasito são prontamente sintetizados em resposta a infecção (FRENKEL et al., 1991), e, neste estudo, ficou evidente a resposta imune humoral mediante os resultados obtidos nas avaliações das imunoglobulinas IgM e IgG. Da mesma forma, é de amplo conhecimento que a toxoplasmose se caracteriza por ativar uma marcante resposta imune celular (DENKERS & GAZZINELLI, 1998), fato que também foi observado quando da verificação no aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 e IL-1. Estes achados, por serem clássicos, acabam validando o modelo experimental adotado e favorecem as conclusões em relação aos mecanismos imunomodulatórios. A avaliação das atividades enzimáticas claramente direcionou para um balanço entre uma resposta pró-inflamatória concomitante com uma tendência a modulação negativa dessa inflamação. Ficou claro que, devido ao aumento da atividade colinérgica da AChE (reduzindo as concentrações de ACh), ocorreu uma tendência à estimulação de mecanismos pró-inflamação, concomitantemente com uma atuação de proteção celular da E-NTPDase pela tentativa de reduzir o ATP extracelular induzindo a um aumento nas concentrações extracelulares de adenosina. Assim, essa ação purinérgica possivelmente foi uma manobra utilizada na tentativa de reduzir os danos teciduais decorrentes de uma resposta excessiva contra a infecção pelo *T. gondii*.

## **6.2 Avaliação *in loco* na toxoplasmose**

Concluídas as avaliações periféricas do comportamento enzimático do sistema purinérgico (E-NTPDase e E-ADA) e colinérgico (AChE e BChE) na toxoplasmose, foi iniciada uma avaliação *in loco* da doença. Para estas avaliações, elegeu-se o cérebro como o

órgão de estudo, principalmente pelo fato do *T. gondii* possuir uma grande capacidade de estabelecer “sítios de privilégio” nesse local (CARRUTHERS & SUZUKI, 2007). Além disso, o modelo experimental foi modificado, utilizando-se camundongos (BALB/c), devido, principalmente, a já existente caracterização da doença cerebral nesta espécie (FERGUSON & HUTCHISON, 1987a, 1987b). Outra particularidade dessa nova etapa foi a utilização de duas diferentes cepas do parasito, uma virulenta [RH (SABIN, 1943)] e outra, denominada de cistogênica [Me-49 (ROOS, et al., 1994)]. A diferença entre essas duas cepas é caracterizada pelo fato de que as linhagens de *T. gondii* tipo I (que compreendem a cepa RH) são extremamente virulentas, produzindo altos níveis de parasitemia, alta morbidade e mortalidade, ao passo que a linhagem do tipo II (onde está classificada a cepa Me-49) leva a cronificação da infecção e produção de cistos teciduais (HOWE & SIBLEY, 1995). Por fim, ao invés de avaliar o mesmo padrão enzimático do sistema purinérgico, nessa etapa foram dosadas as concentrações dos nucleotídeos e nucleosídeos por *HPLC*, acompanhados de uma avaliação da E-ADA. Conseqüentemente, baseado nesse desenho experimental, foi possível avaliar as alterações nos níveis de purinas e atividade da E-ADA em diferentes situações na toxoplasmose cerebral, avaliando-se estes parâmetros nas formas aguda e crônica da doença.

#### 6.2.1 Infecção pela cepa RH do *T. gondii*

A cepa RH do *T. gondii* é utilizada com mais frequência nas pesquisas e no diagnóstico, pois possui rápida replicação, alta produtividade e eficiência em romper as células do hospedeiro (ROOS et al., 1994). Utilizando-se essa cepa, observou-se um aumento nos níveis de purinas em ambos os períodos avaliados (dias 4 e 6 PI), com exceção para inosina que esteve em níveis diminuídos. Essas alterações podem ser explicadas baseadas na característica imunogênica do parasito (DUBEY et al., 1998) e pela participação do sistema purinérgico nos processos inflamatórios (BURNSTOCK, 2006). A liberação de ATP pode ocorrer durante a resposta imune ou por células do endotélio danificadas (LOCOVEI et al., 2006), situações passíveis de serem produzidas pela ação da cepa RH do *T. gondii*, principalmente pela característica de multiplicação rápida de seus taquizoítos, com invasão massiva celular (WEISS & KIM, 2007). O ATP, além de ativar vários mediadores inflamatórios em resposta a doenças infecciosas (BOURS et al., 2006), possui ação direta sobre o protozoário, uma vez que o *T. gondii* é sensível a ação do ATP extracelular

(CORREA et al., 2010). No entanto, se analisarmos a elevação desse nucleotídeo em relação às suas consequências indiretas ligadas à estimulação de uma resposta pró-inflamatória, pode-se considerar que os elevados níveis extracelulares de ATP podem promover o aumento nos níveis intracelulares de cálcio, via receptores P2X, ocasionando importantes danos celulares (EDWARDS et al., 1992). Se essas observações forem analisadas com vistas às desordens nervosas observadas e descritas em infecções cerebrais pelo *T. gondii* (GATKOWSKA et al., 2012), talvez este mecanismo dependente da concentração de ATP extracelular possa contribuir para a exacerbação dessas desordens.

A elevação nas concentrações de outras purinas, como o ADP, AMP e adenosina (ADO), foi provavelmente uma consequência da cascata purinérgica, iniciada pela hidrólise do ATP pela E-NTPDase. Baseado nessa proposição, verificou-se um aumento significativo dos níveis de ADO, quando comparado aos animais não infectados pela cepa RH do parasito. Como já mencionado, a ADO é uma molécula com ação anti-inflamatória, participando ativamente no estabelecimento da resposta imune (CUNHA & RIBEIRO, 2000; CUNHA, 2001; KUMAR & SHARMA, 2009). Considerando o estabelecimento de um mecanismo pró-inflamatório, pela elevação dos níveis extracelulares de ATP, o aumento e a manutenção de elevadas concentrações de ADO extracelularmente pode ter significado uma ação protectora ao tecido avaliado. Os resultados da mensuração da atividade da E-ADA corroboram com esses resultados, visto que em ambos os períodos avaliados, a atividade da E-ADA esteve reduzida, minimizando a hidrólise da ADO. Porém, em contraponto a essa característica protectora, elevados níveis extracelulares de ADO podem favorecer o estabelecimento da doença. Isto se dá pelo fato de que *T. gondii* não é capaz de sintetizar purinas (SCHWARTZMAN & PFEFFERKORN, 1982), e elevados níveis extracelulares de ADO desencadeiam um transporte dessa molécula para o meio intracelular (DEUSSEN et al., 1999), possibilitando o armazenamento pelo *T. gondii* (SCHWAB et al., 1995; CHIANG et al., 1999; De KONING et al., 2003).

Da mesma maneira que o aumento nas concentrações extracelulares de ADO possa ser considerado como uma manobra de potencializar um mecanismo de redução da magnitude da resposta inflamatória, outras moléculas podem ter contribuído para a redução dos danos diretos e indiretos causado pela toxoplasmose. Por exemplo, moléculas como a hipoxantina e xantina, quando catalisadas por ação da xantina oxidase, produzem o ácido úrico que é considerado como um potente antioxidante (SANTOS et al., 1999), e exerce um importante papel na defesa contra o estresse oxidativo na toxoplasmose (ENGIN et al., 2012). A elevação dos níveis de ácido úrico foi observada no dia 6 PI, na infecção pela cepa RH, com tendência

a aumento no dia 4 pós-infecção. Assim, quando analisados conjuntamente, é possível estabelecer que o ácido úrico, juntamente com a adenosina, ao serem detectados em níveis extracelulares elevados, compuseram parte de um mecanismo que buscou estabelecer um efeito protetivo frente à ação danosa do *T. gondii*.

### 6.2.2 Infecção pela cepa Me-49 do *T. gondii*

Outras cepas padrão, dentre as quais a Me-49, tem sido empregadas em estudos relacionados à infecção latente, já que são caracterizadas por menos patogenicidade e pela formação de cistos (ROOS, et al., 1994). Devido à característica de cronicidade induzida pela infecção com a cepa Me-49, os resultados da avaliação das purinas no tecido cerebral diferiram em alguns pontos em relação aos apresentados para a cepa RH, principalmente com a evolução da infecção. Inicialmente (dia 6 PI), os resultados foram semelhantes aos observados para a cepa RH, especialmente pelo aumento nas concentrações de ATP e ADP, e por isso, as discussões sobre as consequências deste aumento seguem a mesma linha de raciocínio abordada anteriormente. As grandes diferenças observadas foram encontradas nos outros dois períodos de avaliação.

No dia 30 PI, as concentrações de ATP e ADP estavam estatisticamente inferiores aos controles, ao passo que no dia 60 PI, com exceção da hipoxantina (sem diferença estatística) e o ácido úrico (em níveis estatisticamente elevados), todas as outras purinas estavam em concentrações bastante reduzidas. A principal hipótese para essa redução progressiva nos níveis de ATP extracelular segue a cinética de diferenciação dos estágios infectivos do *T. gondii* e a resposta imune a esses estágios. A infecção experimental, realizada oralmente com cistos cerebrais coletados de camundongos previamente infectados, permitiu que os bradizoítos (até então contido dentro dos cistos) passassem ilesos pelo ambiente estomacal e fossem liberados no intestino, transformando-se novamente em taquizoítos e iniciando o ciclo assexuado (WEISS & KIM, 2007). Mesmo a cepa Me-49 possuindo características menos virulenta, a disseminação desses novos taquizoítos ocorre, caracterizando-se como uma fase aguda da toxoplasmose e, em consequência, leva a uma estimulação de uma resposta pró-inflamatória. O aumento nos níveis extracelulares de ATP (dia 6 PI) dá suporte a essa hipótese, pelos mesmos mecanismos de estimulação de mediadores inflamatórios ATP-dependentes, mencionados anteriormente.

Com a evolução da doença, ocorre a transformação dos taquizoítos em bradizoítos nos sítios de privilégio. Nestes locais os bradizoítos ficam protegidos por paredes císticas, isolando-os da ação do sistema imune e dando início a infecção crônica, na qual a multiplicação do parasito diminui de forma acentuada e a infecção pode ser mantida por um longo período (WEISS & KIM, 2007). As principais hipóteses para os achados que demonstraram níveis de purinas reduzidos (principalmente no dia 60 PI), são ligadas às lesões causadas em decorrência da infecção pelo *T. gondii* na sua fase proliferativa e pela divisão dos bradizoítos, favorecendo o crescimento dos cistos teciduais. YU et al. (2002) demonstraram que quando ocorre um grande declínio na porcentagem de astrócitos viáveis, concomitantemente acontece uma redução nos níveis de ATP e ADP. Nesse mesmo sentido, nucleotídeos e nucleosídeos podem modular a proliferação, a migração e a diferenciação de astrócitos e células neuronais (RYU et al., 2003), bem como promover a ativação de células da micróglia (DAVALOS et al., 2005; HAYNES et al., 2006). Portanto, os danos celulares provocados pela própria ação direta dos taquizoítos ao se multiplicarem, somados à possibilidade de danos secundários causados por mecanismos pró-inflamatórios em resposta a infecção, poderiam ter causado lesões que levaram à redução dos níveis de ATP e ADP no dia 30 PI. Em apoio a essa hipótese, estão os achados histopatológico, pois no dia 30 PI foi observado um infiltrado inflamatório moderado, composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos, e, em menor número, por macrófagos e neutrófilos, presentes nas meninges e espaços de *Virchow-Robin*. No entanto, não foram observados cistos teciduais compatíveis com toxoplasmose.

Com os bradizoítos encistados, deixando de serem imunogênicos, os únicos mecanismos que levariam a danos ao tecido cerebral se dariam através do crescimento dos cistos, ou através do rompimento dos cistos e liberação dos bradizoítos (WEISS & KIM, 2007). Os cistos teciduais crescem conforme os bradizoítos vão se dividindo por endodiogenia (FERGUSON & HUTCHISON, 1987a; 1987b), variando de acordo com seus tamanhos; cistos jovens tendem a ser menores, contendo um a dois bradizoítos; ao passo que cistos mais velhos podem conter centenas de bradizoítos (DUBEY et al., 1998). Dessa maneira, provavelmente o crescimento dos cistos tenha sido responsável pelo agravamento dos danos às células adjacentes, que indiretamente levaram à redução nos níveis das purinas, como observado claramente no dia 60 PI. Da mesma forma, a histopatologia desse período mostrou que, além dos achados observados no dia 30 PI, os tecidos cerebrais, avaliados no dia 60 PI, possuíam cistos medindo aproximadamente de 30 a 40  $\mu\text{m}$ , preenchidos com bradizoítos.



As concentrações de ADO observados neste modelo de infecção crônica concordaram perfeitamente com a atividade da E-ADA no tecido cerebral, visto que no dia 30 PI a E-ADA demonstrou atividade reduzida, coincidindo com os níveis de ADO que se mostraram com tendência a um aumento, porém sem diferença estatística para esse momento. Por outro lado, no dia 60 PI, a atividade da E-ADA foi estatisticamente superior, quando comparada a atividade desta mesma enzima no grupo controle, corroborando perfeitamente os níveis de ADO reduzidos nesse mesmo período. As consequências dessas variações podem ser interpretadas por duas frentes. Inicialmente (dia 30 PI), provavelmente os níveis de ADO estavam aumentados (mesmo que não estatisticamente) em uma remanescente tentativa de imunomodulação (anti-inflamatória) e proteção contra danos excessivos, consequência de uma resposta imune exacerbada (RATHBONE et al., 1999; BERAUDI et al., 2003; HASKO & CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY & OHTA, 2005; BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007) contra o parasito, já que a ADO “sinaliza” ao sistema imune danos teciduais, principalmente em infecções agudas (KUMAR & SHARMA, 2009).

Por outro lado, o panorama para os níveis de adenosina no dia 60 PI foi completamente diferente, pois seus níveis estavam reduzidos em relação ao grupo controle. A ADO é um importante componente do sistema purinérgico, e seus efeitos mais importantes são descritos nos sistemas cardiovascular e nervoso. No tecido cardíaco, a adenosina produz vasodilatação e diminuição da pressão cardíaca (SATO et al., 2005). Já no sistema nervoso central as principais ações descritas são a modulação da liberação de neurotransmissores, neuroproteção em episódios de isquemia, hipóxia ou de estresse oxidativo (CUNHA, 2001), além de poder induzir a apoptose (WAKADE et al., 1995; BARTH et al., 1997; DI IORIO et al., 2002). A adenosina é ubiquamente presente em todos os tecidos, com receptores distribuídos por todas as células do cérebro, participando diretamente na regulação das sinapses, principalmente pela atuação na liberação de neurotransmissores via ativação de seus próprios receptores (RIBEIRO, 1994), ou pela atuação de interferência em outros receptores (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2000). Dessa forma, os níveis baixos de ADO observados no dia 60 PI, podem fazer parte dos mecanismos que levam as alterações comportamentais tais como a diminuição na atividade exploratória e maior exposição a áreas abertas, observadas em camundongos experimentalmente infectados com *T. gondii* (GATKOWSKA et al., 2012), além de não desempenhar um papel anti-inflamatório, justificando os achados de histopatologia reportados anteriormente. Devido a ações danosas ao tecido nervoso, tais como invasão tecidual do parasito, formação de cistos e migração de células inflamatórias, provavelmente ocorreu uma potencialização de mecanismos efetores de estresse oxidativo,

uma condição já relatada em outros estudos (HAYASHI et al., 1996; ROSENFELD et al., 2005). Essa maior exposição a espécies reativas justificaria os níveis elevados de ácido úrico observado, visto que esta é uma molécula de eficiente participação em mecanismos antioxidantes (SANTOS et al., 1999).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados desta tese, apresentados na forma de três artigos publicados em revistas representativas na área de parasitologia, permitem concluir que os sistemas purinérgico e colinérgico têm uma participação efetiva em mecanismos imunomodulatórios da toxoplasmose.

Sistemicamente, a avaliação da atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA, no sangue e linfócitos, levou à proposição de que seus comportamentos hidrolíticos estariam ligados a uma tentativa de proteção contra danos teciduais secundários, gerados por uma resposta exacerbada à infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Adicionalmente, os dados da atividade da AChE, em amostras correspondentes, comprovaram que a resposta pró-inflamatória foi estabelecida, fortalecendo a hipótese da existência de um mecanismo de modulação da resposta inflamatória.

A análise *in loco* realizada no cérebro, um dos principais sítios de privilégio do *T. gondii*, demonstrou que a cepa RH (virulenta) também apresentou um comportamento pró-inflamatório local, com elevados níveis de ATP extracelular, gerando um efeito citotóxico celular. Esses efeitos citotóxicos, derivados de uma estimulação pró-inflamatória, puderam ser comprovados na infecção que envolveu a cepa Me-49 (cistogênica), tanto pelo aumento do ATP extracelular no início da infecção, como pelos dados de histopatologia que confirmaram lesões por infiltrados inflamatórios, com a identificação de cistos na última avaliação experimental. Por fim, em relação a esse período final, a diminuição na atividade das purinas observada, pode ter sido uma consequência da agravamento da condição celular local em decorrência da evolução da infecção, levando a alterações na participação purinérgica (principalmente do ATP e adenosina) na neurotransmissão nervosa, o que explicaria as alterações de comportamento observadas na toxoplasmose experimental.



## REFERÊNCIAS

ABBOTT, C. A. et al. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. **Clinical Science**, v. 85, n. 1, 77–81, 1993.

ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2006.

AL-KHALIDI, N. W.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 331-334, 1979.

ALDRICH, M. et al. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 272, n. 2, p. 311-335, 2000.

ALIBERTI, J. et al. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 5, p. 485-490, 2003.

AMATO NETO, V. et al. **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 154p. 1995.

AMATO NETO, V.; MARCHI, C. R. Toxoplasmose. In: Cimerman, B. & Cimerman, S. ed. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2. ed. São Paulo, Atheneu, p. 160-177, 2002.

ARAMINI, J. J. et al. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 438-440, 1998.

ARAÚJO, W. N., SILVA, A.V., LANGONI, H. Toxoplasmose: uma zoonose – realidades e riscos. **Revista Cães e Gatos**, v. 79, n. 1, p. 20-27, 1998.

ARPAGAUS, M. et al. O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 124-131, 1990.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 36, n. 2, p. 217-222, 2006.

BARALDI, P. G.; BOREA, P. A. New potent and selective human adenosine A3 receptor antagonists. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 456-459, 2000.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 12, p. 1625-1633, 2002.

BARTH, A. et al. Neurotoxicity in organotypic hippocampal slices mediated by adenosine analogues and nitric oxide. **Brain Research**, v. 762, n. 1-2, p. 79- 88, 1997.

BERMUDES, D. et al. Tandemly Repeated Genes Encode Nucleoside Triphosphate Hydrolase Isoforms Secreted into the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 29252-29260, 1994.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Autonomic Neuroscience**, v. 85, n. 1-3, p. 1-17, 2000.

BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 213-222, 2003.

BIEDERBICK, A. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 19018-19024, 2000.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 5511-5519, 2004.

BIOCCA, E. Alcune considerazioni sulla sistematica dei protozoi e sulla utilita di creare una nuova classe di protozoi. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 8, p. 91-102, 1956.

BLADER, I. J., MANGER, I. D., BOOTHROYD, J. C. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii* infected human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24223-24231, 2001.

BLISS, S. K., ZHANG, Y., DENKERS, E. Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma independent IL-12. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 4, p. 2081-2088, 1999.

BOARDER, M. P.; HOURANI, S. M. O. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 99-107, 1998.

BOEYNAEMS, J. M. et al. P2Y receptor: in the middle of the road. **Trends in Pharmacological Science**, v. 21, p. 1-3, 2000.

BOEYNAEMS, J. M.; COMMUNI, D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 943-944, 2006.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-462, 2000.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BRAUN, N. et al. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochemical Journal**, v. 351, p. 639-647, 2000.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in lower urinary tract. In: Abbracchio MP, Williams M (eds). **Handbook of Experimental Pharmacology**, Volume 151/I. Purinergic and Pyrimidinergic Signalling I - Molecular, Nervous and Urinogenitary System Function. Springer - Verlag: Berlin, p. 423-515, 2001.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling – an overview. **Novartis Found Symposium**, v. 276, p. 26-48, 2006.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31-304, 2004.

BUTCHER, B. A. et al. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3148-3152, 2005.

CARMEN, J. C.; HARDI, L.; SINAI, A.P. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 301-315, 2006.

CARRUTHERS, A. M. et al. Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 6, p. 1533-1541. 2001.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 111-122, 2002.

CARRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 745-751, 2007.

CHADWICK, B. P.; FRISCHAUF, A. M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. **Mammalian Genome**, v. 8, n. 9, p. 668-672, 1997.

CHANNON, J. Y., SEGUIN, R. M.; KASPER, L. H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4822-4826, 2000.

CHAO, C. C. et al. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 178-183, 1993.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 260, n. 3, p. 625-634, 1989.

CHIANG, C. W. The adenosine transporter of *Toxoplasma gondii*. Identification by insertional mutagenesis, cloning, and recombinant expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 35255-35261, 1999.

CODERO, O. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 6, p. 920-930, 2001.



- CORREA, G. et al. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbial and Infection**, v. 12, n. 6, p. 497-504, 2010.
- CORRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the Brain. **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 745-751, 2007.
- COSTA, A. J. et al. Contribuição ao estudo da toxoplasmose canina. **O Biológico**, v. 45, p. 293-297, 1978.
- COSTA, A. J. et al. Toxoplasmosis frequency in equines from the north region of São Paulo State, Brazil. **Ars Veterinaria**, v. 2, p. 75-79, 1986.
- COSTA, A. J. et al., Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 57-62, 2001.
- COURRET, N. et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309-316, 2006.
- CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. ATP as presynaptic modulator. **Life Science**, v. 68, n. 2, p. 119-137, 2000.
- CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 2, p. 107-125, 2001.
- CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Autonomic neural regulation of immunity. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. 2, p. 156-166, 2005.
- DA GAMA, L. M. et al. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 14, p. 1287-1296, 2004.
- DA SILVA, A. S. et al. Relationship between butyrylcholinesterase activity and liver injury in mice acute infected with *Toxoplasma gondii*. **Pathology – Research and Practice**. v. 209, p. 95-98, 2013.

DA SILVA, D. S. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. **The Journal of Parasitology**, v. 89, p. 394-396, 2003.

DAGUER, H. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1133-1137, 2004.

DAJAS-BAILADOR, F.; WONNACOTT, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 317-324, 2004.

DARBOUX, I. et al. The structure-function relationships in *Drosophila neurotactin* show that cholinesterasic domains may have adhesive properties. **EMBO Journal**, v. 15, n. 18, p. 4835-4843, 1996.

DARDÉ, M. L.; AJZENBERG, D. Le polymorphisme du toxoplasme et ses conséquences cliniques. **Archives de Pédiatrie**, v. 10, p. 45-46, 2003.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 12, p. 214-221, 2007.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. **Nature-Neuroscience**, v. 8, p. 752-758, 2005.

DE KONING, H. P. Identification and characterisation of high affinity nucleoside and nucleobase transporters in *Toxoplasma gondii*. **The International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 8, p. 821-831, 2003.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, 2007.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 1, p. 35-41, 2005.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

DESCARRIES, L. et al. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Progress in Neurobiology**, v. 53, n. 5, p. 603-625, 1997.

DESROSIERS, M .D. et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1884-1892, 2007.

DEUSSEN, A. et al. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: Understanding the transmembranous concentration gradient. **Circulation**, v. 99, n. 15, p. 2041–2047, 1999.

DI IORIO, P. Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. **Glia**, v. 38, n. 3, p. 179-190, 2002.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 2005.

DI VIRGILIO, F. et al. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 2, p. 79-87, 2009.

DIANA, J. et al. Migration and maturation of human dendritic cells infected with *Toxoplasma gondii* depend on parasite strain type. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 321-331, 2004.

DIMIER, I. H.; BOUT, D. T. Interferon-gamma activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication, a role for intracellular iron. **Immunology**, v. 94, n. 4, p. 488-495, 1998.

DIXON, A. K. et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 6, p. 1461-1468. 1996.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, p. 155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 350-379, 1974.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals*, p. 101-237. In J. P. Kreier (ed.), Parasitic protozoa, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y, 1977.

DUBEY, J. P. Long term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 910-913, 1988.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals*, p. 1-158. In J. P. Kreier (ed.), Parasitic protozoa, 6<sup>th</sup>. ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y, 1993.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995.

DUBEY, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 6, p. 957-960, 1996.

DUBEY, J. P. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 755-757, 1997.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, 2002.

DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003.

DUBEY, J. P. et al. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1082-1093, 2005.

DUBEY, J. P. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In Weiss LM & Kim K (eds.), *Toxoplasma gondii, the Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. London, UK. Academic Press, p. 1-17, 2007.

DUBEY, J. P. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 157, n. 3-4, p. 299-305, 2008.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2. ed. Boca Raton: CRC, Press, p. 1-318, 2009.

DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses and Public Health*, v. 57, n. 1, p. 60-73, 2010.

DUBYAK, G. R. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 4, n. 4, p. 295-300, 1991.

EDWARDS, F. A.; GIBB, A. J.; COLQUHOUN, D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, v. 359, n. 6391, p. 144-147, 1992.

ELSSNER, A. et al. A Novel P2X (7) receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1beta processing and release. *Journal of Immunology*, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

ENGIN, A. B. Oxidative stress and tryptophan degradation pattern of acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitology Research*, v. 111, n. 4, p. 1725-1730, 2012.

ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. 191-196, 1997.

FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W.M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Archives*, v. 411, n. 1, p. 39-43, 1987a.

FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitology Research**, v. 73, n. 6, p. 483-491, 1987b.

FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 893-897, 2003.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 1-23, 2009.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; SITKOVSKY, M. V. Extracellular ATP in T lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8267-8271, 1990.

FISCHER, H. G. et al. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. **Parasitology Research**, v. 83, n. 7, p. 637-641, 1997.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, p. 139-143, 1997.

FRANCO, R. et al. Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. **Neurochemical Research**, v. 11, n. 3, p. 423-435, 1986.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress of Neurobiology**, v. 52, n. 4, p. 283-294, 1997.

FREDHOLM, B. B. et al. Towards a Revised Nomenclature for P1 and P2 Receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 79-82, 1997.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **Pharmacology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-34. 2011.

FREEMAN, K. et al. Association between congenital toxoplasmosis and preterm birth, low birth weight and small for gestational age birth. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 112, n. 1, p. 31-37, 2005.

FRENKEL, J. K.; FRIEDLANDER, S. **Toxoplasmosis. Pathology of neonatal disease, pathogenesis, diagnosis, and treatment.** Washington, DC: United States Government Printing Office, Public Health Service Publication, n. 141, 1951.

FRENKEL, J. K. Pathogenesis of toxoplasmosis and of infections with organisms resembling *Toxoplasma*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 64, p. 215-251, 1956.

FRENKEL, J. K. et al. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: The Coccidia: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related genera. **University Park Press**. p. 343-410, 1973.

FRENKEL, J. K. et al. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 5, p. 759-763, 1991.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R. Focaccia eds. **Tratado de Infectologia**, São Paulo: Guanabara Koogan, p. 1310-1324. 2002.

FREYRE, A. et al. Oocystinduced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 750-755, 1989.

GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná - Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, p. 91-97, 1999.

GATKOWSKA, J. et al. Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 53-58, 2012.

GEIGER, J. D.; NAGY, J. I. Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 2707-2714, 1986.

GEULA, C.; MESULAM, M. M. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 9, (Suppl. 2), p. 23-28, 1995.

GEVER, J. R. et al. Pharmacology of P2X channels. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 452, n. 5, p. 513-537, 2006.

GESSI, S. et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 3. p. 826-836, 2007.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 18, (Suppl.1), p. S1-5, 2003.

GOEHLER, L. E. et al. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Autonomic Neuroscience**, v. 85, n. 1-3, p. 49-59, 2000.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 194 -210, 2003.

GOLDSZMID, R. S.; TRINCHIERI, G. The price of immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 10, p. 932-938, 2012.

GRIGG, M. E. et al. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infection Disease**, v. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.

GUERRA, A. N. et al. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 4, p. 256-263, 2003.

HALONEN, S. K.; CHIU, F.; WEISS, L. M. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 10, p. 4989-4993, 1998.

HARRIS, H. et al. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. **Annals of Human Genetics**, v. 26, n. 6, p. 359-382, 1963.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunology**, v. 25, n. 1, p. 33-39, 2004.

HAYNES, S. E. et al. The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. **Nature - Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 1512-1519, 2006.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology Infection**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.



HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2012.

IDELSON, G. H. Molecular Diversity of P2 Receptors. **Modulator**, v. 14, p. 11-13, 2001.

JACOBS, L., REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 46, p. 11-21, 1960.

JONES, T. C., BIENZ, K. A.; ERB, P. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 147-156, 1986.

JONES, J. L. et al. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305. 2001.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 845-851, 2012.

KAIZER, R. R. et al. The effect of aluminum on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, p. 381-386, 2007.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 51, p. 33116-33122, 1996.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 1, p. 29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Science**, v. 74, p. 675-696, 2003.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu. 149-156, 2002.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 51, p. 33116-33122, 1996.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 35, n. 12, p. 1305-1320, 1957.

KELLY, M. N. et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.

KHAN, A. et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KHAN, A. et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 37, p. 14872-14877, 2007.

KHAN, A. et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645-655, 2011.

KIM, L.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 10, p. 2119-2126, 2006.

KIM, L. et al. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88- dependent signaling in infected macrophages. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, 2584-2591, 2006.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **The European Journal of Pharmacology**, v. 616, n. 1-3, p. 7-15, 2009.

KUTTY, K. M. Review: Biological function of cholinesterase. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 13, n. 3, p. 239-243, 1980.

LA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 3, p. 339-343, 2003.

LAMBERT, H. et al. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1611-1623, 2006.

LARANJEIRA, N. L. et al. Prevalência da toxoplasmose equina avaliada pela técnica de imunofluorescência indireta, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 99, p. 158-162, 1985.

LAYER, P. G. Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. **BioEssays**, v. 12, n. 9, p. 415-420, 1990.

LAYER, P. G. Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 11, n. 1, p. 7-33, 1991.

LEGER, L.; DUBOSCQ, O. *Selenococcidium intermedium* Leg. et Dub. et la systematiques des sporozoaires. **Archives de zoologie expérimentale et générale**. v. 5, p. 187-238, 1910.

LEGER, L. *Caryospora simplex*, coccidie monosporee et la classification des coccidies. **Archives in Protistenk**, v. 22, p. 71-86, 1911.

LEHMANN, T. et al. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.

LEUCKART, R. **Die Parasiten des Menschen**. 2<sup>nd</sup> ed. G. F. Winter, Leipzig, 344 p., 1879.

LEV-LEHMAN, E. et al. Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression causes transient hematopoietic alterations *in vivo*. **Gene Therapy**, v. 1, n. 2, p. 127-135, 1994.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the Sporozoa. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 208-209, 1970.

LEVINE, N. D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**. CRC, Boca Raton, 1988.

LIEBERMAN, L. A. et al. STAT1 plays a critical role in the regulation of antimicrobial effector mechanisms, but not in the development of Th1-type responses during toxoplasmosis. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 457-463, 2004.

- LIESENFELD, O. et al. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 7, p. 365-376, 1999.
- LINDSAY, D. S. et al. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocist. **Compedium on Continuing Education for the Practicing Veterinary**, v. 19, p. 448-461, 1997.
- LOCOVEI, S.; BAO, L.; DAHL, G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 20, p. 7655-7659, 2006.
- LOPES, W. D. Z. et al. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. **Research Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 104-106, 2010.
- LUNKES, G. I. et al. NPTDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 65, n. 1, p. 1-6, 2004.
- MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews - Immunology**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2007.
- MASON, N. J. et al. TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin- 12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5662-5667, 2004.
- MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.
- MATTHAY, M. A.; WARE, L. B. Can nicotine treat sepsis? **Nature – Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1161-1162, 2004.
- McKEE, A. S. et al. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 4, p. 2632-2640, 2004.
- MELLO, U. Un cas de toxoplasmose du chien observé a Turin. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v. 3, p. 359-363, 1910.

MENDELOWITZ, D. Advances in parasympathetic control of heart rate and cardiac function. **News in Physiological Science**, v. 14, p. 155-161, 1999.

MESULAM, M. M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.

MILLER, J. B. Zoonoses de pequenos animais. In: ETTINGER, S.J & FELDMAN, E.C. (Eds.). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 1. edição. São Paulo: Manole, Cap. 65, vol. 1, 1495, p., 1997.

MOLESTINA, R. E.; SINAI, A. P. Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF- $\kappa$ B activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 24, p. 5785-5796, 2005.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet** v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MOURA, L. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 326-329, 2006.

MULERO, J. J. et al. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20064-20067, 1999.

MUN, H. S. et al. Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* through B-2 cell-mediated downregulation of host defense responses. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 7, p. 533-542, 2003.

NETO, J. O. A. et al. Prevalence and risk factors for anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3-4, p. 329-332, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, p. 174-187, 1995.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences**. v. 147, p. 763-766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences** v. 148, p. 369-372, 1909.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 4, p. 1013-1067, 2002.

OLAH, M. E.; STILES, G. L. Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 581-606, 1995.

OLIVEIRA, M. A. et al. *Leishmania* sp: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. **Experimental Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 96-105, 2000.

O'NEILL, J. O.; DOUKAS, P. H. **Farmacologia clínica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PERRY, E. et al. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 4, n. 4, p. 273-277, 1978.

PERRY, E. et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends in Neuroscience**, v. 22, n. 6, p. 273-280, 1999.

PESCADOR, C. A. et al. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 167-171, 2007.

PEYRON, F. Long-Term Follow-up of Patients with Congenital Ocular Toxoplasmosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 993-994, 1996.

PINHEIRO JUNIOR, J. W. et al. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 105, n. 3, p. 709-715, 2009.

POCHE, F. Das System der Protozoa. **Archives in Protistenk.** v. 30, p. 125-321, 1913.

PRADO, M. A. M. et al. Regulation of Acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, n. 5, p. 291-299, 2002.

PRANDOVSKY, E. et al. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 23866, 2011.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signalling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, n. 3, p. 133-40, 2003.

RAMIREZ, M. J. et al. 5-HT<sub>2</sub> receptor regulation of acetylcholine release induced by dopaminergic stimulation in rat striatal slices. **Brain Research**, v. 757, n. 1, p. 17-23, 1997.

RANG, H. P. et al. **Dependência e abuso de fármacos**. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. (Ed.). Farmacologia. Elsevier, São Paulo, Brasil, p. 676-695, 2004.

RATHBONE, M. P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress Neurobiology**, v. 59, n. 6, p. 663-690, 1999.

RIBEIRO, J. A. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. **Pharmacology & Toxicology**, v. 77, n. 5, p. 299-305, 1994.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signaling**, v. 2, p. 409-430, 2006.

ROGERS, R. C.; HERMANN, G. E.; TRAVAGLI, R. A. Brainstem pathways responsible for oesophageal control of gastric motility and tone in the rat. **Journal of Physiology**, v. 514, n. 2, p. 369-383, 1999.

RONET, C. et al. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 2, p. 899-908, 2005.

ROOS, D. S. et al. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Methods in Cell Biology**, v. 45, p. 27-63, 1994.

ROSEMBERG, D. B. NTPDase family in zebrafish: nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 3, p. 230-240, 2010.

RUDIN, C. et al. Toxoplasmosis during pregnancy and infancy. **Swiss Medical Weekly**, v. 139, n. 43-44, p. 643-644, 2008.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K., Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 6, p. 1161-1166, 1980.

RYU, J. K. et al. Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. **Journal of Neuroscience Research**, v. 72, n. 3, p. 352-362, 2003.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.

SABIROV, R. Z.; OKADA, Y. ATP release via anion channels. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 4, p. 311-328, 2005.

SALVATORE, C. A. et al. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 21, p. 10365-10369, 1993.

SAMRA, N. A. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa. **Journal South African Veterinary Association**, v. 78, n. 3, p. 116-120, 2007.

SANTOS, C. X.; ANJOS, E. I.; AUGUSTO, O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 372, n. 2, p. 285-294, 1999.

SATO, A. et al. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 4, p. 1633-1640, 2005.



SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 69, n. 5, p. 313-340, 2003.

SCHWAB, J. C. et al. *Toxoplasma gondii* tachyzoites possess an unusual plasma membrane adenosine transporter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 70, n. 1-2, p. 59-69, 1995.

SCHWARTZMAN, J. D.; PFEFFERKORN, E. R. *Toxoplasma gondii*: Purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. **Experimental Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 77-86, 1982.

SCREMIN, O. U. et al. Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. **Brain Research Bulletin**, v. 42, n. 1, p. 59-70, 1997.

SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 9, p. 341-346, 2000.

SÉVIGNY, J. et al. Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5640-5647, 2000.

SHAH, N. et al. Muscarinic receptors and ligands in cancer. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 296, n. 2, p. C221-C232, 2008.

SHER, A. et al. Induction and regulation of IL-12- dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunology Research**, v. 27, n. 2-3, p. 521-528, 2003.

SHI, J. D. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 17474-17478, 2001.

SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 329-351, 2008.

SILVA, N. M. et al. *Toxoplasma gondii*: The severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 167-177, 2010.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1314p, 1998.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1386, n. 1, p. 65-78, 1998.

SIMS, T. A.; HAY, J.; TALBOT, I. C. An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma* tissue cysts within the brains of mice with congenital toxoplasmosis. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 70, n. 3, p. 317-325, 1989.

SITKOVSKY, M. V. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. **Nippon Ika Daigaku Zasshi**, v. 65, n. 5, p. 351-357, 1998.

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: The A<sub>2</sub> adenosine receptors? **Trends in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 299-304, 2005.

SKALLOVÁ, A. et al. The role of dopamine in *Toxoplasma*-induced behavioural alterations in mice: an ethological and ethopharmacological study. **Parasitology**, v. 133, n. 5, p. 525-535, 2006.

SNEDDON, P. et al. Modulation of purinergic neurotransmission. **Progress in Brain Research**, v. 120, p. 11-20, 1999.

SPALDING, S. M. et al. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 38, n. 2, p. 173-177. 2005.

SPANVELLO, R. M. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon  $\beta$ . **Neurochemical Research**, v. 31, p. 455-462, 2006.

SPLENDORE, A. Un nuovo protooz parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il Kala - azar dell'umo. Nota prelininare pel, **Revista Social Ciência e Medicina**, v. 03, p. 109, 1908.

SRIDHAR, G. R. et al. Serum butyrylcholinesterase in type 2 diabetes mellitus: a biochemical and bioinformatics approach **Lipids in Health and Disease**, v. 4, p. 18, 2005.

SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to Molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2010.

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 201-210, 2009.

TASSI, P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. **Parassitologia**, v. 49, n. 1-2, p. 7-15, 2007.

TATO, C. M. et al. Inhibition of NF-kappa B activity in T and NK cells results in defective effector cell expansion and production of IFN-gamma required for resistance to *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3139-3146, 2003.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. **Acetylcholine**. In: SIEGEL, G. J. et al (eds) **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 213-242, 1999.

TENTER, A. M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 2, p. 289-296, 2007.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 418-428, 2009.

VASSORT, G. Adenosine 5-triphosphate: a P2-purineric agonist in the myocardium. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 767-806, 2001.

VENTURA, M. A.; THOMOPOULOS, P. ATP and ADP activate distinct signalling pathways in human promonocyte U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxy-vitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v. 47, p. 104-114, 1995.

VIDOTTO, O. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em equínos procedentes de quatro estados (SP, PR, MS e MT) abatidos em Apucarana, PR. **Semina Ciências Agrárias**, v. 18, p. 9-13, 1997.

VILLENA, I. et al. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 160-162, 2004.

VOGEL, M. et al. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata*. **Biochemical Journal**, v. 278, n. 1, p. 199-202, 1991.

WAKADE, T. D. et al. Adenosine-induced apoptosis in chick embryonic sympathetic neurons: a new physiological role for adenosine. **The Journal of Physiology**, v. 488, n. 1, p. 123-138, 1995.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 11392-11399, 1998.

WANKO, T.; JACOBS, L.; GAVIN, M. A. Electron microscope study of *Toxoplasma* cysts in mouse brain. **Journal of Protozoology**, v. 9, p. 235-242, 1962.

WEISS, L. M.; KIM, K. *Toxoplasma gondii*. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Elsevier, Burlington (US), 801p., 2007.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, v. 35, n. 2, p. 174-197, 1980.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 7, p. 299-316, 1993.

WRIGHT, D.; PLUMMER, D. Multiple forms of acetylcholinesterase from human erythrocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 3, p. 521-527, 1973.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

YU, A. C. et al. Changes of ATP and ADP in cultured astrocytes under and after in vitro ischemia. **Neurochemistry Research**, v. 27, n. 12, p. 1663-1668, 2002.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 49, n. 6, p. 589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, S. et al. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1840-1847, 2006.



## **ANEXOS**





## ANEXO I

Experimental Parasitology 135 (2013) 325–330



Contents lists available at ScienceDirect

## Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes associated with the immune response of rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*

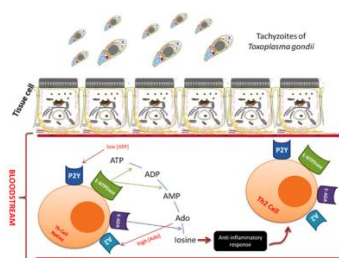
Alexandre A. Tonin<sup>a,\*</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>b</sup>, Jader B. Ruchel<sup>c</sup>, João F.P. Rezer<sup>c</sup>, Giovana Camillo<sup>d</sup>, Luciana Faccio<sup>c</sup>, Raqueli T. França<sup>a</sup>, Daniela B.R. Leal<sup>c</sup>, Marta M.M.F. Duarte<sup>e</sup>, Fernanda F. Vogel<sup>d</sup>, Mario L. de la Rue<sup>c</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Small Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil<sup>b</sup> Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil<sup>c</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil<sup>d</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil<sup>e</sup> Universidade Luteranda do Brasil – ULBRA, Santa Maria, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis with high seroprevalence in South America.
- Purinergic signaling plays an important role modulating the inflammatory and immune responses.
- E-NTPDase and E-ADA activities were investigated in lymphocytes of animals infected with *T. gondii*.
- Increased activities of them were observed on lymphocytes.
- It is possible to suggest their involvement triggering an anti-inflammatory response.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 November 2012

Received in revised form 11 July 2013

Accepted 15 July 2013

Available online 30 July 2013

## Keywords:

Lymphocytes

Enzymes

E-NTPDase

E-ADA

Toxoplasmosis

## ABSTRACT

An investigation of E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes from rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii* was carried out in this study. For this purpose, twenty four adult male Wistar rats were divided in two groups/four subgroups (A1 and A2; B1 and B2–6 animal/each group), with “A” as uninfected and “B” inoculated with *T. gondii* (RH strain). Sampling was performed on days 5 and 10 post-infection (p.i.), with evaluation of hemogram, immunoglobulins (IgM and IgG) and activity of E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes. Enzymes assays showed ATP hydrolysis increased on days 5 ( $P < 0.05$ ) and 10 ( $P < 0.01$ ) p.i., as well as an increase of ADP hydrolysis on day 10 ( $P < 0.01$ ) p.i. E-ADA activity on lymphocytes was also increased in both evaluated periods ( $P < 0.01$ ). Based on E-NTPDase and E-ADA increased activities observed on lymphocytes, it is possible to suggest their involvement in an anti-inflammatory response, consisting of a modulatory response, preventing excessive tissue damage caused by the infection with *Toxoplasma gondii*.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Toxoplasmosis, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, is a worldwide zoonosis with very high seroprevalence in South America. Toxoplasmosis is usually asymptomatic in immunocompetent adults, but can cause mortality in the very young and the

\* Corresponding author. Address: Departamento de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi – 9, Veterinarian Hospital, Room 103, CEP 97105900 Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 3220 8885.

E-mail address: [tonin\\_alexandre@yahoo.com.br](mailto:tonin_alexandre@yahoo.com.br) (A.A. Tonin).

## Influence of *Toxoplasma gondii* Acute Infection on Cholinesterase Activities of Wistar Rats

Alexandre Alberto Tonin<sup>1,\*</sup>, Aleksandro Schafer da Silva<sup>2</sup>, Maria Luiza Thorstenberg<sup>3</sup>, Livia Gelain Castilhos<sup>3</sup>, Raqueli Teresinha França<sup>1</sup>, Daniela Bitencourt Rosa Leal<sup>3</sup>, Marta Maria Medeiros Frecura Duarte<sup>4</sup>, Fernanda Silveira Flores Vogel<sup>5</sup>, Mario Luiz de La Rue<sup>3</sup> and Sonia Terezinha dos Anjos Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Small Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil; <sup>2</sup>Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil; <sup>3</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil; <sup>4</sup>Universidade Luteranda do Brasil-ULBRA, Santa Maria, Brazil; <sup>5</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

**Abstract:** Several studies have shown the mechanisms and importance of immune responses against *Toxoplasma gondii* infection and the notable role of cholinesterases in inflammatory reactions. However, the association between those factors has not yet been investigated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the acetylcholinesterase (AChE) activity in blood and lymphocytes and the activity of butyrylcholinesterase (BChE) in serum of rats experimentally infected with *T. gondii* during the acute phase of infection. For that, an in vivo study was performed with evaluations of AChE and BChE activities on days 5 and 10 post-infection (PI). The activity of AChE in blood was increased on day 5 PI, while in lymphocytes its activity was enhanced on days 5 and 10 PI ( $P < 0.05$ ). No significant difference was observed between groups regarding to the activity of BChE in serum. A positive ( $P < 0.01$ ) correlation was observed between AChE activity and number of lymphocytes. The role of AChE as an inflammatory marker is well known in different pathologies; thus, our results lead to the hypothesis that AChE has an important role in modulation of early immune responses against *T. gondii* infection.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, acute toxoplasmosis, acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE)

### INTRODUCTION

*Toxoplasma gondii* is a ubiquitous coccidian parasite of the Phylum Apicomplexa, the largest and most important group of obligate parasites. It is unusual within this group in its capacity to parasitize a diverse array of cell types and infect virtually any warm-blooded animal [1]. *T. gondii* is a remarkably successful organism; around one-third of the world's population is seropositive for this parasite. Seroprevalence increases with age and varies around the world [2]. Thus, in the USA, the overall seroprevalence is around 20-25% but in El Salvador, France, and Brazil, for example, it may be as high as 75-80%.

Exposure to pathogenic threats activates inflammatory reactions, followed by a fast and crucial anti-inflammatory responses [3]. This limits the inflammatory processes below a certain

threshold, ascertaining survival and avoiding autoimmune diseases or spreading of the inflammatory components into the bloodstream, which may lead to septic shock [3]. Primary infections with *T. gondii* stimulate production of high levels of interleukins, such as IL-12 and IFN- $\gamma$ , by cells of the innate immune system, being central efforts to resistance to the disease [4]. In recent years, descriptions about the participation of the cholinergic system in the inflammatory response has been described [5-7].

Cholinergic signaling is notably involved in anti-inflammatory reactions [8] and cholinesterase enzymes are present in cholinergic and non-cholinergic tissues. They are divided into 2 classes, i.e., acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) according to their catalytic properties and specificity for substrates, sensitivity to inhibitors, and tissue distribution [9,10]. AChE and BChE both catalyse the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), a fundamental process in regulating the cholinergic system [10,11]. AChE (EC 3.1.1.7) is a membrane-bound enzyme found mainly in the brain, muscles, erythrocytes, lymphocytes and cholinergic neurons [9,12] that preferentially hydrolyses esters with acetyl group.

•Received 15 March 2013, revised 23 May 2013, accepted 5 June 2013.

\*Corresponding author (tonin.aat@gmail.com)

© 2013, Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



## ANEXO III

Experimental Parasitology 142 (2014) 51–58



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

## Influence of infection by *Toxoplasma gondii* on purine levels and E-ADA activity in the brain of mice experimentally infected mice



Alexandre A. Tonin<sup>a,b,\*</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>c,\*</sup>, Emerson A. Casali<sup>d,e</sup>, Stephanie S. Silveira<sup>d</sup>, Cesar E.J. Moritz<sup>d</sup>, Giovana Camillo<sup>f</sup>, Mariana M. Flores<sup>g</sup>, Rafael Figuera<sup>g</sup>, Gustavo R. Thomé<sup>e</sup>, Vera M. Morsch<sup>e</sup>, Maria Rosa C. Schetinger<sup>e</sup>, Mario De La Rue<sup>a,b</sup>, Fernanda S.F. Vogel<sup>f</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Department of Small Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>c</sup> Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil

<sup>d</sup> Department of Morphological Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>e</sup> Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

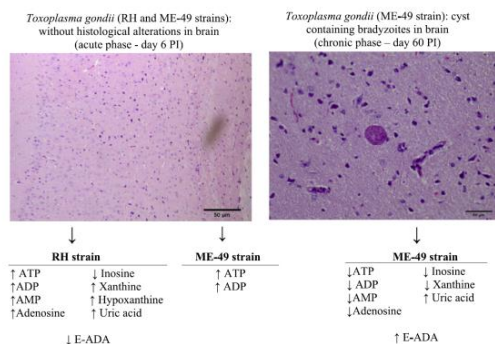
<sup>f</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

<sup>g</sup> Department of Veterinary Pathology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Toxoplasmosis is a zoonosis of worldwide distribution, caused by *Toxoplasma gondii*.
- Toxoplasmosis can cause encephalitis, with the presence of the parasite in the CNS, and behavioral alterations.
- The purinergic system consists of purines, which play different vital functions in mammals.
- *T. gondii* infection cause changes the purine levels and the activity of E-ADA in brain.
- Changes in purines levels can participate in disease pathogenesis and behavioral alterations.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 August 2013

Received in revised form 3 April 2014

Accepted 14 April 2014

Available online 24 April 2014

## Keywords:

Toxoplasmosis

Purinergic signaling

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess the purine levels and E-ADA activity in the brain of mice (*BALB/c*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. In experiment I ( $n = 24$ ) the mice were infected with RH strain of *T. gondii*, while in experiment II ( $n = 36$ ) they were infected with strain ME-49 of *T. gondii*. Our results showed that, for RH strain (acute phase), an increase in both periods in the levels of ATP, ADP, AMP, adenosine, hypoxanthine, xanthine (only on day 6 PI) and uric acid (only on day 6 PI). By the other hand, the RH strain led, on days 4 and 6 PI, to a reduction in the concentration of inosine. ME-49, a cystogenic strain, showed some differences in acute and chronic phase, since on day 6 PI the levels of ATP and ADP were increased, while on day 30 these same nucleotides were reduced. On day

\* Corresponding authors. Address: Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil (A.A. Tonin).

E-mail addresses: [tonin\\_alexandre@yahoo.com.br](mailto:tonin_alexandre@yahoo.com.br) (A.A. Tonin), [aleksandro\\_ss@yahoo.com.br](mailto:aleksandro_ss@yahoo.com.br) (A.S. Da Silva).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.008>

0014-4894/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.