

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

MIGUEL JUNIOR SORDI BORTOLINI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR NA
MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS
COM *TOXOPLASMA GONDII*.**

UBERLÂNDIA - MG

2014

MIGUEL JUNIOR SORDI BORTOLINI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR NA
MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS
COM *TOXOPLASMA GONDII*.**

**Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor.**

Orientador: José Roberto Mineo

Co-orientador: Nilson Penha Silva

UBERLÂNDIA - MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B739a Bortolini, Miguel Junior Sordi, 1977-
2014 Avaliação da influência do exercício físico regular na modulação do sistema imunológico de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* / Miguel Junior Sordi Bortolini. - 2014.
168 f. : il.

Orientador: José Roberto Mineo.

Coorientador: Nilson Penha Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. Parasitologia - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Silva, Nilson Penha. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

MIGUEL JUNIOR SORDI BORTOLINI

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR NA
MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS
COM *TOXOPLASMA GONDII*.

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor.

Uberlândia, 26 de junho de 2014

Prof. André Luis Lacerda Bachi

Prof. Albená Nunes da Silva

Prof. Jair Pereira da Cunha Júnior

Co-Orientador: Nilson Penha Silva, UFU/MG

Orientador: José Roberto Mineo, UFU/MG

Especialmente a esta Mulher, minha mãe, um *Ser Humano* que convivi por 36 anos 8 meses e 8 dias dedico esta tese. Dedico também a minha esposa Cristiane Soares Ferreira Bortolini, a minhas filhas Maria Eduarda e Serena, e às minhas Irmãs Maria Luiza, Margot Paula e Márcia Rejane. Deixo a todas estas mulheres de minha vida meus eternos agradecimentos.

AGRADECIMENTO

O mundo é um laboratório, e por certo não tem tantos controles, mas viver dia após dia permite-nos crescer em infinitas áreas almeçadas e testar quantas hipóteses pudermos imaginar. Quando temos um tutor, às dificuldades são menores, pois este nos instiga a procurar, a pesquisar, a explorar e a nos desafiar. Quando vamos realizar um experimento ele nos solicita que analisemos este está condizente com os objetivos e após a realização dos experimentos e das análises, escuta-nos e sugere modificações, mas sempre valoriza a experiência. Assim o todo da produção é superior ao resultado do experimento. Este tutor mostra-nos que seguir protocolos é necessário, mas entendê-los é essencial. Às vezes quando identificamos que um experimento não revelou um resultado esperado queremos descartá-lo, o tutor olha, analisa e nos mostra que na realidade o "erro" pode ser uma porta aberta a "um novo pensar".

Assim, foi minha a vida até aqui, um laboratório, tive uma tutora infinitamente sábia, que me "ensinava a pescar", que não me dava "o peixe" se eu não fizesse valer. Esta tutora me mostrou que Deus existe e me ensinou que o respeito por mim e pelo próximo deve haver sempre. Deu-me carinho, proteção nas horas que necessitei, ensinou-me que viver é doar-se e que se doando, recebe-se sem cobrar. Esta tutora foi minha mãe, Geni Luiza Sordi Bortolini. (Obs: Quando escrevi esta dedicatória o verbo estava no presente, infelizmente tive que modificar a conjugação, mas nunca ficará no passado). A senhora mãe, faz-se presente, em cada ato meu, seja profissional ou pessoal. Para minha amada mãe meu eterno agradecimento.

A construção de uma tese de doutorado pode ser redigida por um, mas se deve a muitos. Desta forma, agradeço à Deus Pela saúde, paz, vida e oportunidade.

À minha família pelo suporte nos dias difíceis, pela ajuda da construção de meu caráter, pelo carinho e pelo Amor.

Ao Professor e orientador José Roberto Mineo por ter acreditado em mim, pela oportunidade dada, pelos ensinamentos mesmo a distância e em sala de aula.

Ao Professor e co-orientador Nilson Penha Silva pelo suporte ao projeto, pelas aulas ministradas e pela inspiração enquanto profissional.

À Ismair Teodoro Reis pelo ombro amigo, pelo trabalho compartilhado, pelos ensinamentos recebidos.

Aos colaboradores: Murilo Vieira Silva, Fabio Moreno Alonso, Luciana A. Medeiros, Fernando Reis Carvalho, Lourenço F. Costa, Patrício S. C. Barros, Silas Silva Santana, Caroline Martins Mota, Arlindo Gomes Macedo Jr. e Rômulo Oliveira Sousa meus sinceros agradecimentos, pois sem vocês a estrada teria sido extremamente árdua, seus empenho, ideias, ações e amizade fizeram a diferença para mim (Figura 60). Muito obrigado.

Ao grupo de Imunologia do Exercício e Saúde: Cesar A. F. Abrahão, Wener B. Resende, Pedro A. S. Nogueira, Luciana Alves Medeiros, Fabio Moreno Alonso, Ismair Teodoro Reis e José Roberto Mineo, colaboradores que me ajudaram a acreditar que valia a pena e pelo apoio em vários experimentos, especialmente no sacrifício e coleta de amostras biológicas (Figura 59).

Aos Professores Tiago Mineo e Neide M. da Silva pelo suporte em vários experimentos.

Aos professores do PPIPA, em especial à Deise Aparecida Oliveira Silva e Neide Maria da Silva pelos ensinamentos proferidos na forma de aulas, cursos, palestras ministradas e sugestões.

Aos técnicos do PPIPA (Marley Dantas Barbosa, Max Aor Marques, Taisa Carrijo de Oliveira, Ana Cláudia Arantes Marques Pajuaba, Luceleide de Freitas Queiroz e Lucélia da Costa Assis) e a todas as meninas da limpeza e aos seguranças da UFU pelos préstimos de vossos trabalhos, compreensão e companheirismo.

Aos Senhores, Carlos Humberto de Oliveira, Catarino D. Alcantara (Pardal), Kaio A. Lopes e Moacir José da Silva pelo apoio na construção dos equipamentos que realizei as pesquisas.

À todos os colegas do PPIPA, em especial à Cristina, Laiane, Loiane, Paulo Victor pelo companheirismo.

A meus amigos André e Todão pela amizade e confidências.

À todos, que nos corredores da UFU e que por um só instante passaram e contribuíram de alguma forma para esta tese meu muito obrigado.

"O único lugar onde o sucesso vem antes do
trabalho é no dicionário."

Vince Lombardi, 1913.

Persistência é a alma do ser que procura e
ultrapassa as barreiras.

Do próprio autor

RESUMO

A prática regular de exercício físico tem sido relacionado com melhoras imunopatológicas, especialmente durante o processo de envelhecimento quando pode haver um estado de imunocomprometimento. O *Toxoplasma gondii* é um parasito protozoário que causa infecção oportunista de forma global, podendo apresentar consequências severas, particularmente ao feto e pacientes imunocomprometimentos. É estimado que um terço da população mundial esteja atualmente infectado por este parasito, sendo a reativação durante a imunossenescência um tópico em saúde pública não explorado. O presente estudo foi projetado para avaliar parâmetros de diferenças imunológicas entre camundongos machos C57BL/6 exercitados e sedentários que tenham sido infectados por *T. gondii*. Antes dos experimentos chaves vários outros conjuntos de experimentos foram realizados para prospecção dos principais achados desta tese. Houve dois conjuntos de experimentos principais: no primeiro conjunto de experimentos, os animais foram infectados após o início dos exercícios formando-se três grupos: um grupo controle - sedentário não infectado (NIS, IS, n=4); dois grupos infectados - um sedentário (IS, n=4) e um exercitado (IEx, n=6). Quando esplenócitos foram estimuladas com antígeno de taquizoíto solúvel de *T gondii* (STAg), encontrou-se uma maior produção de IFN- γ , concomitante à uma manutenção das taxas de IL-10, que permitiu uma maior razão de IFN- γ /IL10 ($P < 0,0001$) para o grupo exercitado comparado com o sedentário. No entanto, não houve diferenças no que diz respeito a quantificação de DNA genômico de *T. gondii* pelas análises de qPCR e imunohistoquímica de cistos cerebrais ($P > 0,05$). Com objetivo de se pesquisar posteriormente as consequências destes dados para o hospedeiro, um segundo conjunto de experimentos foram realizados, quando os animais foram infectados antes do início dos exercícios, e quatro grupos foram estabelecidos para comparação deste propósito, como se segue: dois grupos controles não infectados - sedentário (NIS, n=6) e exercitado (NIEx, n=6), e dois grupos infectados - sedentário (IS, n=7) e exercitado (IEx, n=6). Encontrou-se que o grupo infectado exercitado teve sua longevidade aumentada ($P < 0,05$) comparado com o infectado sedentário. Em ambos os conjuntos de experimentos, os camundongos foram submetidos à exercícios moderados: de corrida (14 m/min; 3 x/semana) e resistido (60-80% de uma repetição máxima;

2x/semana). Em síntese, exercícios físicos aeróbicos e resistidos moderados são capazes de modular a resposta do sistema imune no combate da infecção por *T. gondii* sendo estas características imunológicas benéficas para o hospedeiro.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*. Modelo murino. Resposta imune. Saúde. Taxa de IFN- γ /IL10. Parasitologia. Exercício resistido. Citocinas.

ABSTRACT

Physical exercise has been implicated in several immunophysiological improvements especially during the aging process when an immunocompromised status could be established. *Toxoplasma gondii* is a protozoan parasite that causes a widespread opportunistic infection, which may present severe consequences, particularly to the fetus and immunocompromised patients. It is estimated that one-third of the human population worldwide has been infected by this parasite, being the reactivation during immunesenescence an unexplored public health issue. The present study was designed to assess the immunophysiological differences between exercised versus sedentary C57BL/6 male mice that have been infected by *T. gondii*. Before the two key set of experiments, several other sets were carried out to the prospection of the main found data of this study. There were two main sets of experiments: in the first set, the animals were infected after exercising and three groups were formed: experimental groups - infected sedentary (IS, n=6); infected exercised (IEx, n=6) and control group - non-infected sedentary (NIS, n=6). When splenocytes were stimulated by *T. gondii*-soluble tachyzoite antigens, it was found an significant increasing ($P<0.0001$) in interferon-gamma (IFN- γ) production concomitant with any changes in IL-10, allowing a greater IFN- γ /IL-10 ratios, produced by the cells from exercised group compared to sedentary one. However, there was no difference concerning quantification of *T. gondii* genomic DNA by qPCR and immunohistochemistry analysis in brain cysts ($P>0.05$). In order to further investigate the consequences of these data for the host, a second set of experiments was performed, when the animals were infected before exercising and four groups of animals were established for comparison purpose, as follows: experimental groups - infected sedentary (IS, n=7); infected exercised (IEx, n=6) and control groups - non-infected sedentary (NIS, n=6) and non-infected exercised (NIEx, n=6). It was found that exercised group survived longer ($P<0.05$) than sedentary one. In both sets of experiments, mice have been submitted to moderate exercises: running (14m/min; 3x/week) and strength (60-80% of one-repetition maximum; 2x/week). In summary, moderated aerobic and strength exercises are able to modulate immune responses against *T. gondii* infection, being these immunological features beneficial to the host.

Key words: *Toxoplasma gondii*. Murine model. Immune response. Health. IFN- γ /IL10 ratio. Parasite. Strength exercise. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O ciclo de vida complexo do <i>T. gondii</i> enfatizando a manutenção da vida da fase sexuada e transmissão ambiental aos seres humanos.	23
Figura 2 - Resposta imune inata ao <i>Toxoplasma gondii</i> durante a infecção.	27
Figura 3 - Diagrama da célula hospedeira sendo sequestrada para ser competente, comprometida, e concomitante ao <i>Toxoplasma gondii</i>	29
Figura 4 - Fatores associados com interconvenção de taquizoítas e bradizoíta.	32
Figura 5 - TgAaaH 1 e 2 codificam tirosina hidroxilase com substrato não usual específico	39
Figura 6 - Fontes celulares de IFN γ durante a infecção por <i>T. gondii</i>	42
Figura 7 - Mecanismo efetor mediado pelo IFN γ na eliminação do parasito em células infectadas.....	43
Figura 8 - Papel provável de hormônios no curso da infecção por <i>P. brasiliensis</i>	45
Figura 9 - O risco de Infecção em relação a atividade física.....	59
Figura 10 - Proposta de relação da curva em S entre a carga de treinamento e taxa de infecção.....	60
Figura 11 - Modelo proposto entre nível de treinamento de atividade física e risco de infecção.....	60
Figura 12 - Esquema proposto para o efeito anti-inflamatório tardio, via HPA dependente de IL-6 muscular, pós-exercício	65
Figura 13 - Mecanismos de envelhecimento.....	67
Figura 14 - Modelo proposto da relação entre envelhecimento, risco de infecção e atividade física	69
Figura 15 - Relação proposta entre hábito de exercício e função imunológica ao longo da vida.....	69
Figura 16 - Fases equivalentes da vida dos camundongos C57BL/6 comparados com os humanos.....	71
Figura 17 - Desenho esquemático proposto e protótipo construído.....	82
Figura 18 - Protótipo do aparato de escalada para exercício resistido	83
Figura 19 - Aparato de escalada para exercício resistido	84

Figura 20 - Conjunto de aparatos que permite controlar a carga do treinamento resistido	84
Figura 21 - Labirinto em Cruz.....	85
Figura 22 - Esteira adaptada para camundongos (exercício aeróbico)	86
Figura 23 - Labirinto "nada e cruz"	87
Figura 24 - Desenho esquemático do experimento 2.....	89
Figura 25 - Peso dos camundongos C57BL/6 e BALB/c ao longo do tempo para o experimento 2	90
Figura 26 - Avaliação de uma repetição máxima (1 RM) de camundongos C57BL/6 e BALB/c	91
Figura 27 - Contagem de cistos a fresco em cérebro de camundongos C57BL/6 versus BALB/c	92
Figura 28 - Gordura visceral de camundongos BALB/c frente a infecção por <i>T. gondii</i> 93	
Figura 29 - Modelo esquemático do experimento 3	94
Figura 30 - Quantidade de cistos no 30º dia após infecção para o experimento 3	94
Figura 31 - Modelo esquemático dos experimentos 4 e 5.....	95
Figura 32 - Experimentos 6. Desenho esquemático do experimento	96
Figura 33 - Peso dos camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 6	97
Figura 34 - Avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 6	98
Figura 35 - Índice ELISA de Imunoglobulinas anti- <i>T. gondii</i> para o experimento 6.....	99
Figura 36 - Quantificação de DNA de <i>T. gondii</i> para o experimento 6	100
Figura 37 - Experimentos 8: modelo esquemático	102
Figura 38 - Peso dos camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 8	103
Figura 39 - Avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 8	104
Figura 40 - Avaliação de força de camundongos C57BL/6 em seus respectivos grupos ao longo do tempo para o experimento 8.....	105

Figura 41 - Índice ELISA de Imunoglobulina-G total anti- <i>T. gondii</i> para o experimento 8	106
Figura 42 - Índice ELISA de Imunoglobulina-G _{2a} anti- <i>T. gondii</i> para o experimento 8	107
Figura 43 - Índice ELISA de Imunoglobulina-M anti- <i>T. gondii</i> para o experimento 8 ..	108
Figura 44 - Índice ELISA de Imunoglobulina-G ₁ anti- <i>T. gondii</i> para o experimento 8 ..	109
Figura 45 - Primeiro conjunto de experimentos: desenho esquemático do experimento e soroconversão.....	112
Figura 46 - Primeiro conjunto de experimentos: avaliação da carga parasitária	113
Figura 47 - Primeiro conjunto de experimentos: Estímulos in vitro de esplenócitos e perfil de IFN- γ e IL-10 e sua razão	114
Figura 48 - Primeiro conjunto de experimentos: mensuração de peso e temperatura de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo	116
Figura 49 - Segundo conjunto de experimentos: desenho esquemático do experimento e soroconversão.....	117
Figura 50 – Segundo conjunto de experimento: curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 exercitados versus sedentários, infectados e não infectados.....	118
Figura 51 - Segundo conjunto de experimento: peso dos camundongos C57BL/6 ao longo do tempo	119
Figura 52 - Segundo conjunto de experimentos: avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo.....	120
Figura 53 - Segundo conjunto de experimentos: avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo.....	121
Figura 54 - Miguel e Sr. Caju (Carlos Humberto de Oliveira)	161
Figura 55 - Sr. Pardal (Catarino D. Alcantara).	162
Figura 56 - Construção dos aparatos de acrílico.....	163
Figura 57 - Sr. Moacir José da Silva.	164
Figura 58 - Sr. Kaio A. Lopes	165
Figura 59 - Grupo de estudo de Imunologia do Exercício.	166
Figura 60 Equipe (amigos) do Laboratório de Imunoparasitologia.....	167
Figura 61 - Minha mãe, Sra. Geni Luiza Sordi Bortolini.	168

Quadro 1 - Elementos de atividade física e exercício	50
Quadro 2 - Termos de Glossário	51
Quadro 3 - Principais efeitos do exercício agudo versus moderado tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa	62
Tabela 1 - Proteínas específicas de taquizoíta e bradizoíta	34
Tabela 2 - Classificação da intensidade da atividade física	52
Tabela 3 - Intensidade de trabalho ocupacional.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPase	Adenosina trifosfatase
cMyc	Gene promotor da proliferação de células satélites
CD3 ⁺	Linfócitos T
CD3 ⁺ CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares
CD3 ⁺ CD8 ⁺	Linfócitos T citolíticos
ConA	Concavalina A
CX3CL1	Fractalcina
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
GLUT4	Transportador de glicose do tipo 4
IL-1 α	Interleucina-1alfa
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IgM	imunoglobulinas M
IgG	imunoglobulinas G
IgG ₁	imunoglobulinas G do tipo 1
IgG _{2a}	imunoglobulinas G do tipo 2A

IFN- γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago perfil, pró-inflamatório
M2	Macrófago perfil, anti-inflamatório
MCP-1	Proteína 1 quimiotática de monócitos
MDC	Quimiocina derivada de macrófago
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NF κ B	Fator nuclear de cadeia leve capa B.
NK	Células assassinas naturais
NO	Óxido Nítrico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKB (Akt)	Proteína quinase B
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferador peroxissomal do tipo G
ROP (s)	Roptria (s)
ROS	Radicais livres derivados de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio
sIgA	Imunoglobulina do tipo A - Secretória
STAg	Antígeno solúvel de formas de taquizoítos de <i>T. gondii</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral do tipo α
uPA	Sistema da uroquinase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>TOXOPLASMA GONDII</i>	21
1.1.1	<i>TOXOPLASMA GONDII</i> : SINTOMAS E DOENÇAS	37
1.1.2	INFECÇÃO POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> E MECANISMOS DE EVASÃO IMUNE DA CÉLULA.....	40
1.1.3	SUSCEPTIBILIDADE AO <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	40
1.1.4	<i>TOXOPLASMA GONDII</i> E SUA RELAÇÃO COM O GÊNERO.....	44
1.2	SEDENTARISMO.....	47
1.3	EXERCÍCIO FÍSICO.....	48
1.3.1	TIPOS DE EXERCÍCIO	49
1.3.1.1	EXERCÍCIO RESISTIDO	53
1.3.1.2	EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO	55
1.4	MÚSCULO ESQUELÉTICO	57
1.5	SISTEMA IMUNOLÓGICO E EXERCÍCIO FÍSICO.....	58
1.5.1	MÚSCULO ESQUELÉTICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO	63
1.6	ENVELHECIMENTO E SISTEMA IMUNE: ATIVIDADE FÍSICA	66
2	OBJETIVOS.....	73
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
3	MATERIAL E MÉTODOS	74
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	74
3.2	INFECÇÃO ORAL	74
3.3	EXPERIMENTO DE SOROCONVERSÃO	75
3.4	PERFIL DE CITOCINAS.....	75
3.5	ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>T. GONDII</i>	75
3.6	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EX VIVO	76
3.7	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	76
3.8	ANÁLISES DE IMUNOHISTOQUÍMICA	77
3.9	EXERCÍCIOS FÍSICOS	78

3.9.1	EXERCÍCIO AERÓBICO.....	78
3.9.2	EXERCÍCIO RESISTIDO	79
3.10	MENSURAÇÃO DE PESO E DA TEMPERATURA.....	79
3.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	80
4	RESULTADOS.....	81
4.1	PRÉ EXPERIMENTAÇÃO.....	81
4.2	EXPERIMENTO 1: TESTE DO EXERCÍCIO AERÓBICO	87
4.3	EXPERIMENTO 2: TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO <i>T. GONDII</i> DE DUAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS (C57BL/6 E BALB/C) COM TREINAMENTO PRÉVIO	88
4.4	EXPERIMENTO 3: SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS BALB/C AO <i>T. GONDII</i> DOSE-DEPENDENTE DE CISTOS	93
4.5	EXPERIMENTOS 4 E 5: VALIDAÇÃO DO APARATO DE ESCALADA PARA HIPERTROFIA	95
4.6	EXPERIMENTO 6: TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO <i>T. GONDII</i> DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM TREINAMENTO PRÉVIO	96
4.7	EXPERIMENTO 8: TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS C57BL/6, COM TREINAMENTO PRÉVIO, AO <i>T. GONDII</i> UTILIZANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE CISTOS (5, 10 E 15).....	101
4.8	EXPERIMENTOS FINAIS: RESULTADOS.....	111
4.8.1	PRIMEIRO CONJUNTO DE EXPERIMENTOS	111
4.8.2	SEGUNDO CONJUNTO DE EXPERIMENTOS	116
4.9	RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES DE 1-RM DOS DOIS CONJUNTOS DE EXPERIMENTOS.....	120
5	DISCUSSÃO	122
6	CONCLUSÃO	132
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
7	APÊNDICE	161

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasito oportunista que apresenta uma distribuição global com estimativas de infectar um terço da população mundial (WEISS; DUBEY, 2009). Esse parasito é o agente causador da toxoplasmose, doença especialmente importante na infecção congênita e reativação de imunossuprimidos (DESMONTS; COUVREUR, 1974; LESER et al., 2003). Foi descrito recentemente que esta doença pode estar associada com distúrbios mentais, como a esquizofrenia (PRANDOVSKY et al., 2011; MCCONKEY et al., 2013). Nesta perspectiva, tem sido sugerido que pacientes esquizofrênicos infectados por *T. gondii* possam ter maiores graus de severidade dos sintomas e que os homens infectados podem desenvolver esta doença precocemente (HOLUB et al., 2013). Neste contexto, um sistema imune competente é essencial na prevenção à reativação de *T. gondii* (SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

No que diz respeito ao processo de envelhecimento, vários sistemas do organismo reduzem progressivamente a função imune, e a reativação da infecção por *T. gondii* torna-se potencial neste período (GARDNER; REMINGTON, 1978b;1978a). A diferença de susceptibilidade entre gêneros, a diversos patógenos, tem sido relatada: a *Paracoccidioides brasiliensis* (PINZAN et al., 2010), à *Plasmodium chabaudi* (BENTEN; WUNDERLICH; MOSSMANN, 1992; BENTEN et al., 1997) e ao *T. gondii* (KITTAS et al., 1984; ROBERTS; CRUICKSHANK; ALEXANDER, 1995; WALKER et al., 1997).

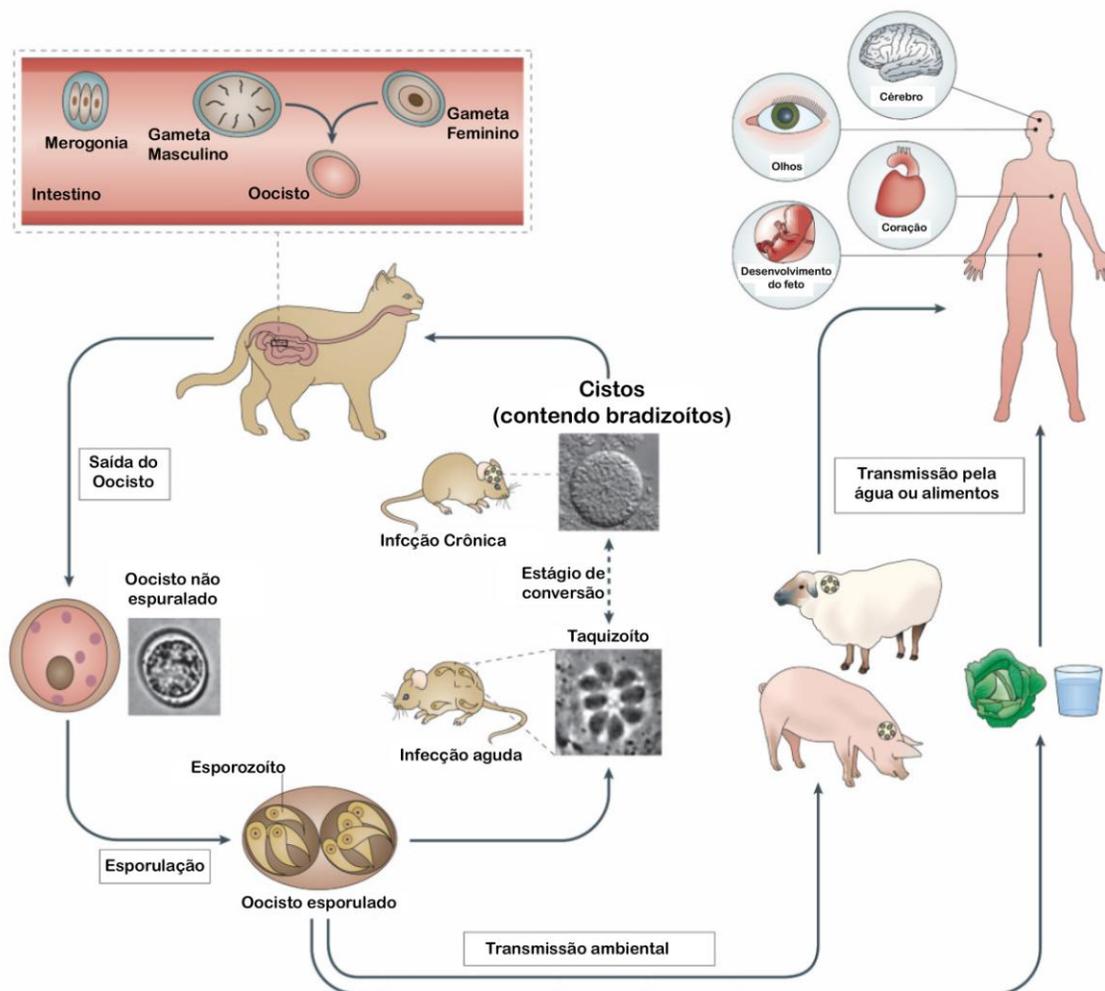
1.1 Toxoplasma gondii

O parasita *Toxoplasma gondii* causa a toxoplasmose (FERREIRA et al., 2008). É estimado que ele tenha infectado um terço a população mundial (WEISS; DUBEY, 2009). Esta é uma doença especialmente importante na infecção congênita e reativação em imunodeprimidos (LESER et al., 2003), sendo geralmente assintomática ou associada a manifestações inespecíficas em indivíduos imunocompetentes (MONTROYA; HUFFMAN; REMINGTON, 2004). Ele é um importante patógeno oportunista que se dissemina por infecção congênita no feto em desenvolvimento (DESMONTS; COUVREUR, 1974), causando complicações neurológicas severas em

indivíduos imunocomprometidos (LUFT et al., 1993), e patologia ocular mesmo em indivíduos saudáveis (ROBERTS; MCLEOD, 1999).

A descoberta do *Toxoplasma gondii* deve-se aos pesquisadores Nicolle e Manceaux (1908), os quais encontraram um protozoário no tecido de um roedor africano denominado *Ctenodactylus gundi* (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Achava-se, inicialmente que o protozoário seria um piroplasma, entretanto estudos posteriores determinaram que se tratava de um novo organismo. No Brasil, também em 1908, Splendore observou o mesmo parasita, erroneamente confundido com a *Leishmania*, em outro hospedeiro, o coelho (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Hoje se sabe que o toxoplasma pode ser encontrado em várias espécies de animais, incluído o homem e primatas não humanos (FERGUSON, 2009). Na figura 1 representa-se o ciclo de vida heteróximo facultativo deste parasito.

Figura 1 - O ciclo de vida complexo do *T. gondii* enfatizando a manutenção da vida da fase sexuada e transmissão ambiental aos seres humanos.



Os felinos são os hospedeiros definitivos onde ocorre sua replicação sexual. Seguindo a replicação nos enterócitos do intestino (um processo chamado como merogonia), os gametas masculino e feminino são formados dentro da célula do hospedeiro, como descrito previamente (DUBEY; FRENKEL, 1972). A fusão de gametas leva a uma formação de oocistos diploides que são expelidos nas fezes do gato e sofrem meiose no ambiente para gerar oito descendentes haploides. Oocistos são capazes de sobreviverem no ambiente por longos períodos de tempo e podem contaminar alimentos e água, provendo uma rota de infecção para hospedeiros intermediários. Nos hospedeiros intermediários (mostrado aqui nos roedores) ocorre a replicação assexuada. Infecção aguda é caracterizada por replicação rápida de taquizoítos que dissemina-se através do corpo. Diferenciação para crescimento lento de bradizoítas nos cistos teciduais leva a infecção crônica de longo prazo. Ingestão de cistos teciduais via alimentação de onívoros, herbívoros e carnívoros pode levar a transmissão para outros

hospedeiros intermediários ou felinos, os quais reiniciam a fase sexuada do ciclo de vida. Muitos animais servem como hospedeiros intermediários incluindo animais do campo. Humanos se tornam infectados através da alimentação com carne mal passada contendo cistos teciduais ou através da ingestão de oocistos contidos na água (DE MOURA et al., 2006; JONES; DUBEY, 2012). Embora a maioria das infecções são brandas, a toxoplasmose pode causar sintomas severos no cérebro e outros órgãos (como indicado) em paciente imunocompromissados, assim como no desenvolvimento do feto seguindo infecção congênita.

Fonte: Hunter e Sibley (2012).

A infecção primária é caracterizada por um rápido crescimento de taquizoítas, que infecta uma ampla gama de células nucleadas rapidamente em um ciclo lítico (SU et al., 2003). Na resposta seguinte, a resposta imune inata e adaptativa, o parasito se diferencia em estágio de crescimento baixo tecidual referido como bradizoíta, que reside como cistos no tecidos contidos em células de vida longa (e.g.: Neurais) (SU et al., 2003). A transmissão entre os hospedeiros intermediários é facilitada pela habilidade dos cistos teciduais em causarem infecções orais na ingestão por outros hospedeiros intermediários, uma característica que distingue o *T. gondii* de seus parentes mais próximos (SU et al., 2003). A propagação assexuada tem levado a uma estrutura populacional altamente clonada que distingue dramaticamente as linhagens presentes com fenótipos diferentes em termos de virulência em camundongos de laboratório (SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Análises genotípicas de isolados de *T. gondii* têm identificado uma população estruturada constituída de três linhagens clonais mundialmente difundidas, denominadas tipo I, II, e III (HOWE; SIBLEY, 1995). Dentre estas a cepa do tipo II tem uma alta prevalência geral nas infecções humanas (HOWE; SIBLEY, 1995).

Na revisão de Dubey, Lindsay e Speer (1998) sobre *T. gondii* é apresentado que primariamente sua infecção pode ser mundialmente disseminada, causando lesões no cérebro, olhos, fígado, pulmões, nódulos linfáticos, e até mesmo morte em indivíduos imunocomprometidos, tais como, pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência adquirida (AIDS) e pacientes com câncer sob terapia imunodepressivas. Em mulheres grávidas, o *T. gondii* pode ser transmitido tranplacentariamente ao feto, resultando na

destruição de tecidos e aumentando os defeitos de desenvolvimento no feto ou neonato (DUBEY et al., 1998)

Em 1948, desenvolveu-se uma técnica sorológica com o objetivo de identificar em humanos e animais infectados com parasita pelas características dos anticorpos contra *Toxoplasma gondii* (SABIN; FELDMAN, 1948).

Experimentalmente existem dois tipos de infecções que são realizadas, a oral, em que formas císticas ou oocísticas são introduzidas, geralmente por gavagem; e a intraperitoneal, em que as formas mais utilizadas são as císticas e as traquizoíticas que são injetadas no espaço peritoneal (FERGUSON, 2002; HUNTER; SIBLEY, 2012; MEYER; ALLAN; BEAMAN, 2013). O trabalho de Meyer, Allan e Beaman (2013) vêm reforçar o fato de que a via intraperitoneal, apesar de não ser a via natural de infecção, é menos sujeita a variações em comparação à via oral. No entanto, estes autores ressaltam que a via de infecção afeta dramaticamente a evolução da infecção, tanto por afetar a replicação do parasito, quanto por interferir na expansão das populações e subpopulações das células linfoides.

Tem sido sugerido ainda que a via oral seja utilizada em trabalhos direcionados às análises *in vivo* da resposta mais complexa imune induzida contra o *T. gondii*, assim como estudos terapêuticos de análise da eficácia de novas drogas (MEYER et al., 2013).

Foi demonstrado que a rota de infecção de *T. gondii* (intraperitoneal versus oral) afeta os efeitos da toxoplasmose em murinos para diferentes linhagens clonais (JOHNSON, 1984). A infecção oral utilizando linhagens de *T. gondii* de baixa virulência (Me49) mostrou ter efeitos diferentes em camundongos, dependendo de qual linhagem pura de camundongos foi usada, sendo o camundongo do tipo C57BL/6 particularmente susceptível (MCLEOD et al., 1984). A mortalidade de camundongos C57BL/6, depois da infecção por via oral, parece ser devido à severa necrose do intestino delgado mostrando este ser dependente de células T CD4⁺ e mediado por interferon gama (INF γ) (LIESENFELD et al., 1996).

O *Toxoplasma gondii* apresenta três tipos especiais de organelas secretórias que auxiliam o parasita na invasão da célula hospedeira. Estes tipos incluem

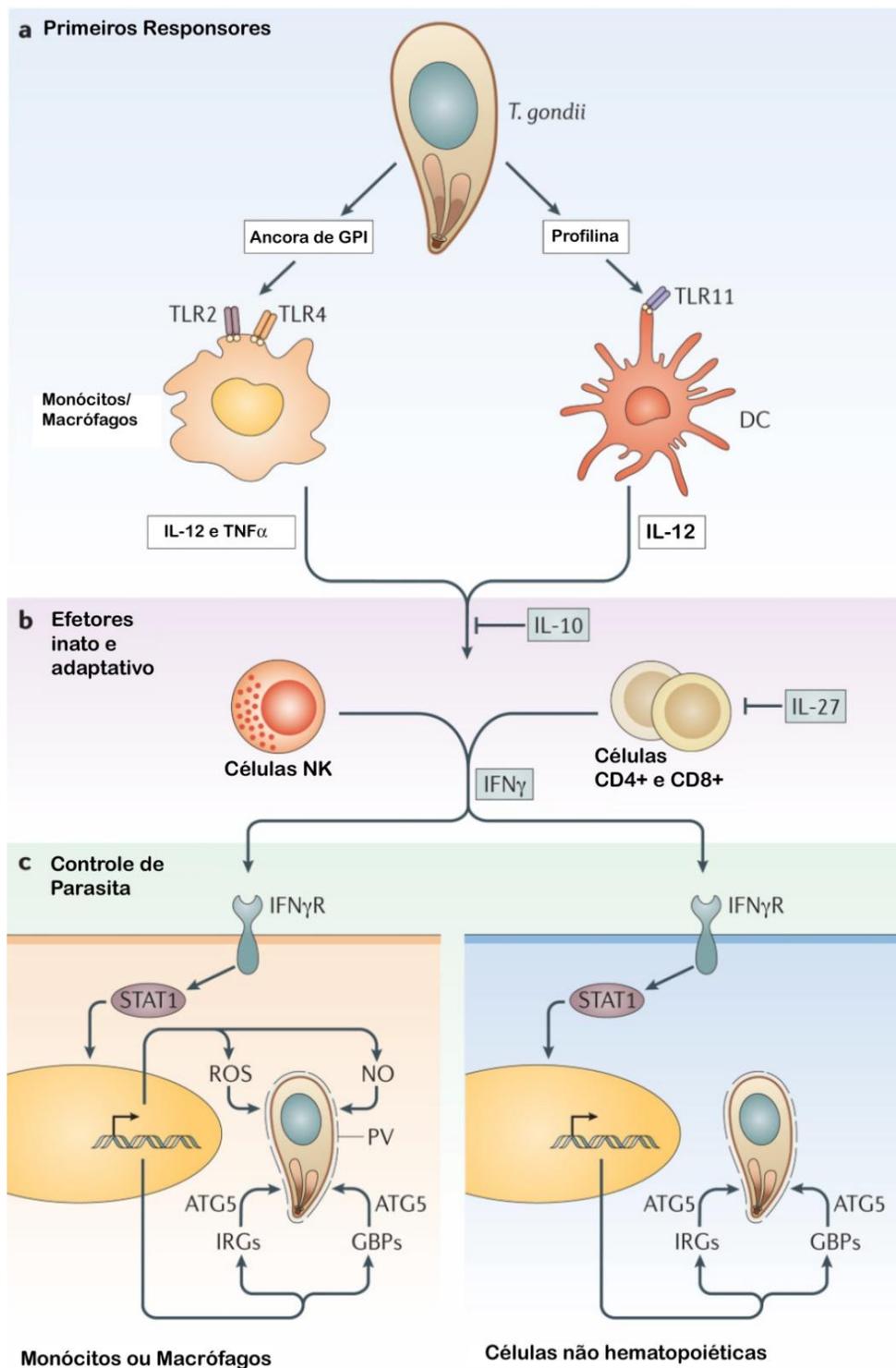
microfilamentos em forma de cigarro (MICs), roptrias (ROPs) em formato de bulbo e grânulos densos esféricos. Micronemas (microfilamentos) e roptrias estão localizados perto do término apical e grânulos densos estão distribuídos por todo o parasito. O processo de invasão da célula hospedeira pelo *T. gondii* inicia-se com a fixação transitória do parasito na célula hospedeira. Então, o evento de sinalização mediada por cálcio resulta em uma secreção de MICs para a superfície do parasito que permite à este estabelecer uma interação firme com a célula hospedeira (SAFFER et al., 1992; DUBREMETZ; SCHWARTZMAN, 1993; BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008; BREINICH et al., 2009).

A proteína ROP18 é uma serina/treonina quinase diretamente relacionada à virulência do toxoplasma (HUNTER; SIBLEY, 2012). Existem três tipos de virulência: tipo I (muito virulenta), II (intermediária) e III (pouco virulenta) têm mais atividade, intermediária e pouca atividade, respectivamente (TAYLOR et al., 2006).

O *Toxoplasma gondii* nutre-se dentro do vacúolo parasitóforo (PV) uma vez que entra na célula hospedeira (ALEXANDER et al., 2005; CAO et al., 2009). A formação do PV é provavelmente devido ao estabelecimento de uma junção móvel (MJ) entre a célula hospedeira e o taquizoíta durante a invasão (ALEXANDER et al., 2005; CAO et al., 2009). A MJ se forma quando o *T. gondii* se fixa nos receptores da célula hospedeira e libera MICs e proteínas do pescoço-roptérios (RONs), os quais se juntam na interface do parasito e na superfície da célula hospedeira (ALEXANDER et al., 2005; CAO et al., 2009).

O hospedeiro imunocompetente, assim que entra em contato com o *T. gondii* desencadeia resposta imunológica inata e depois adaptativa para tentar eliminar o parasito, como se pode observar na figura Figura 2 (HUNTER; SIBLEY, 2012).

Figura 2 - Resposta imune inata ao *Toxoplasma gondii* durante a infecção.



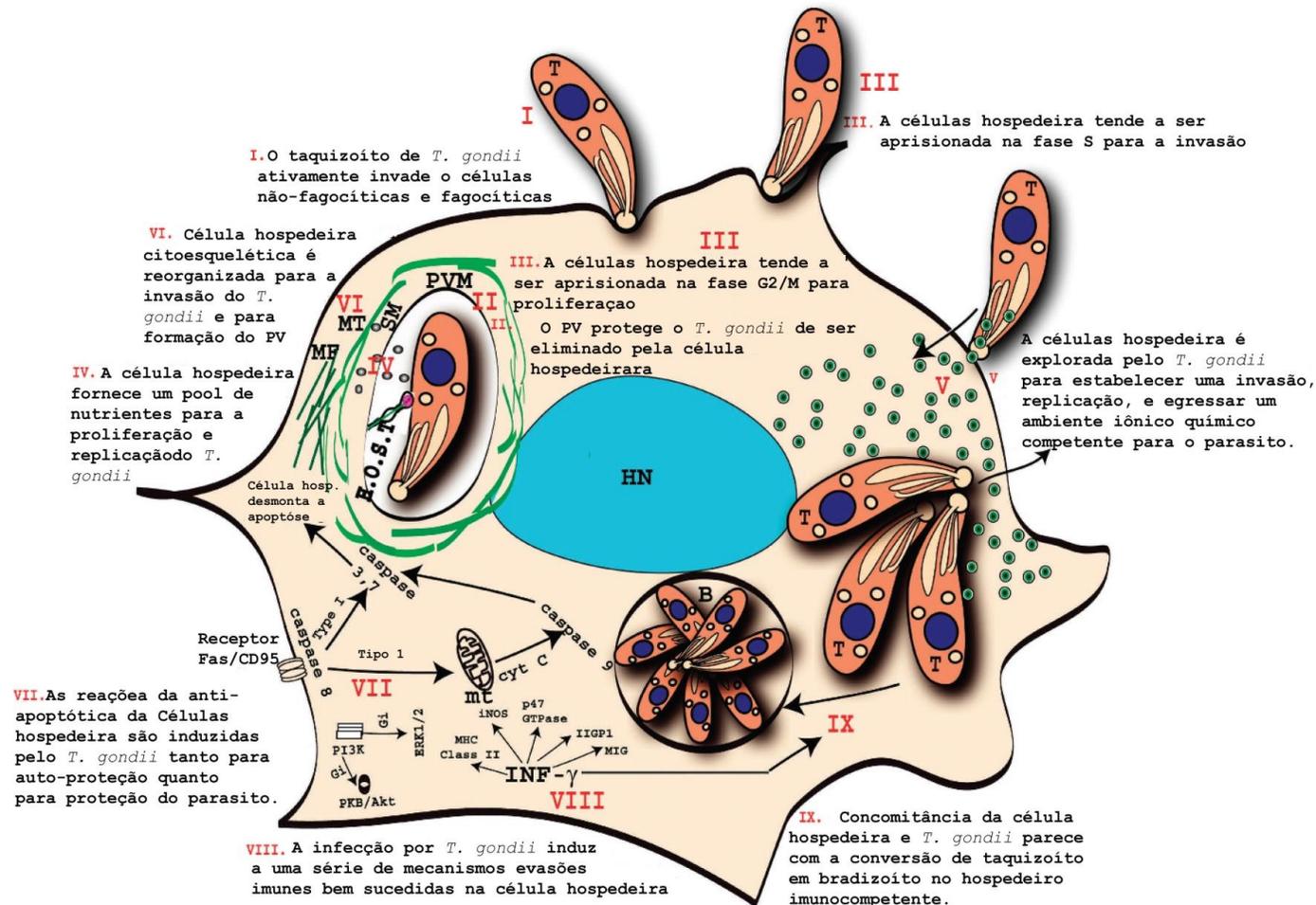
a) Infecção precoce, as primeiras células a responderem são as células dendríticas (DCs) e monócitos/macrófagos. Interação de porfirinas do *T. gondii* com TLR11 nas DCs é muito importante para

produção de IL-12. Além disso, ao estimular a produção de IL-12 macrófagos induzem também fator de necrose tumoral (TNF- α), um cofator em atividade antimicrobial, nas resposta para detecção de proteínas ancoradoras de GPI via TLR2 e TLR4. b) A resposta imune resulta na produção de interferon gama (IFN- γ) de células naturais killers (NK) através da resposta inata e eventualmente de células T CD4⁺ e CD8⁺ assim como resposta adaptativa ocorre. IL-10 e IL-27 são chaves para modular estas vias e prevenir a superprodução de citocinas Th1. c) Produção de IFN- γ durante a fase inata e adaptativa é responsável pela ativação celular para controlar a infecção do parasito. IFN- γ propaga um sinal através da superfície de seu receptor (IFN- γ R) para ativar STAT1, um fator de transcrição nuclear que controla a expressão de muitos genes. Em resposta à atividade de STAT1, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio são reguladas para cima em monócitos/macrófagos, ambos os quais contribuem para o controle de parasitos intracelulares. Ambas células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas também aumentam a expressão de duas famílias de proteínas defensoras chamadas GTPases de imunidade relacionadas (IRGs) e proteínas ligantes de guanilatos (GBPs), as quais são recrutadas para vacúolos contendo patógenos e são envolvidas na depuração do parasito. As funções das IRGs e GBPs dependem da proteína de autofagia Atg5.

Fonte: Hunter e Sibley (2012).

A invasão e sobrevivência do *T. gondii* dentro da célula hospedeira é muito íntima e está envolvida a vários fatores, em especial a mitocôndria, conforme figura 3 (PENG; CHEN; LINDSAY, 2011):

Figura 3 - Diagrama da célula hospedeira sendo sequestrada para ser competente, comprometida, e concomitante ao *Toxoplasma gondii*.



(I) *Toxoplasma gondii* ativamente invade células não fagocíticas e fagocíticas.

(II) O vacúolo parasitóforo (PV) protege o *T. gondii* de ser eliminado pela célula hospedeira, especialmente da acidificação endossomal e fusão

lisosomal.

(III) A célula hospedeira é induzida a ser competente a infecção por *T. gondii* e permite sua proliferação através do controle do ciclo celular da célula hospedeira. A célula hospedeira é induzida a parada na fase S para a invasão do *T. gondii* que a induz na entrada da fase G2/M para a proliferação do *T. gondii*.

(IV) A célula hospedeira fornece um “pool” de nutrientes para a proliferação e replicação do *T. gondii*. *Toxoplasma gondii* faz poros na membrana do PV (PVM) para mudar sua permeabilidade, permitindo que moléculas pequenas se difundam através da PVM. Os outros nutrientes, como o colesterol, são translocados através de microtúbulos da célula hospedeira (MTs) para o PV, e invagina de forma intacta para dentro do PVM através de estruturas H.O.S.T. contendo MTs do hospedeiro. Após os nutrientes entrarem no PV, eles similarmente entram no parasito através de transporte de membrana.

(V) A célula hospedeira é explorada pelo *T. gondii* para estabelecer uma invasão, replicação e saída competente de substâncias (Ion) para o ambiente do parasita.

(VI) O citoesqueleto da célula hospedeira é reorganizado para facilitar a formação do PV e invasão do *T. gondii*. Microtúbulos formam estruturas similares a um cesto que envolve o PV na célula infectada. A íntima interação entre o *T. gondii* e Microtúbulos da célula hospedeira resulta na supressão de divisão celular e/ou causa defeitos mitóticos, assim, fornece um grande espaço para multiplicação do parasito. (VII) Reações anti-apoptóticas da célula hospedeira são induzidas pelo *T. gondii* para tanto para proteção dela própria quanto do parasito, principalmente através da regulação da via de receptor de morte celular, a via do NF-kB, e a via da PI3K. (VIII) A infecção por *Toxoplasma gondii* induz vários mecanismos de evasão imune de sucesso da célula hospedeira. *Toxoplasma gondii* induz ao bloqueio da via de sinalização de IFN- γ para o controle da infecção crônica e latente ou induz a célula hospedeira infectada ser menos responsiva ao aumento da regulação da via induzida por IFN- γ de muitos genes, incluindo classe II de MHC, iNOS, e da p47 GTPases. (IX) A associação da célula hospedeira e *T. gondii* aparece com a conversão de taquizoítos em bradizoítos em células imunocompetentes.

Abreviações: T: taquizoíto; B: bradizoíto; HN: núcleo do hospedeiro; PVM: membrana do vacúolo parasitóforo; MT: Microtúbulos; MF: microfilamentos; mt: mitocôndria; SM: moléculas pequenas; H.O.S.T: sequestro de organelas do hospedeiro host.

Fonte: Peng; Chen; Lindsay (2011).

Usualmente o *T. gondii* desencadeia a ruptura da célula hospedeira e egresso do parasita antes da indução da apoptose de célula hospedeira, antes inibida (PERSSON et al., 2007). Esta interferência do *T. gondii* com a apoptose da célula hospedeira está relacionada a fatores de virulência da cepa de *T. gondii* (ANGELONI et al., 2009) e depende do tipo de célula a ser infectada (VUTOVA et al., 2007; HIPPE et al., 2008). Os mecanismos são, principalmente, através da regulação dos receptores de morte (HIPPE et al., 2008) e de NF κ B (PAYNE; MOLESTINA; SINAI, 2003) e da via da PI3K (YANG et al., 2004), especialmente a PKB/Akt (GOEBEL; GROSS; LUDER, 2001).

O *Toxoplasma gondii* contrapõe-se à cascata de morte mediada pelo receptor de morte Fas/CD95 de célula hospedeira tipo I e II (VUTOVA et al., 2007; HIPPE et al., 2008). No tipo I de células hospedeiras, similar as células SKW6.4, o *T. gondii* bloqueia esta cascata apoptótica diretamente através da interferência com a caspase 8 (VUTOVA et al., 2007; HIPPE et al., 2008). No tipo II, similar a células HeLa, o *T. gondii* reduz significativamente a apoptose desencadeada por Fas/CD95 através da inibição da atividade de iniciador da caspases 8 e 9 e efetores da caspases 3/7, através do decréscimo da função apoptogênica de mitocôndrias no loop de amplificação mitocondrial (VUTOVA et al., 2007; HIPPE et al., 2008).

A PKB inativa o fator de transcrição da família da Forkhead (FKHR1), o qual induz a genes de apoptose, reduz a ativação das moléculas da caspases, e regula para baixo a expressão da polimerase ADP-ribose (GOEBEL et al., 2001). O *T. gondii* ativa a PI3-quinase através da via de sinalização transmitida pelo heterodímero da proteína Gi, resultando na fosforilação de PKB/Akt e ERK1/2 MAPK (KIM; DENKERS, 2006). Ambas em experimentos *in vitro* e em *in vivo* tem demonstrado que após os fagócitos de camundongos serem infectados por *T. gondii*, a via da PKB/Akt é ativada, e a indução da apoptose em macrófagos infectados é prevenida (KIM; DENKERS, 2006).

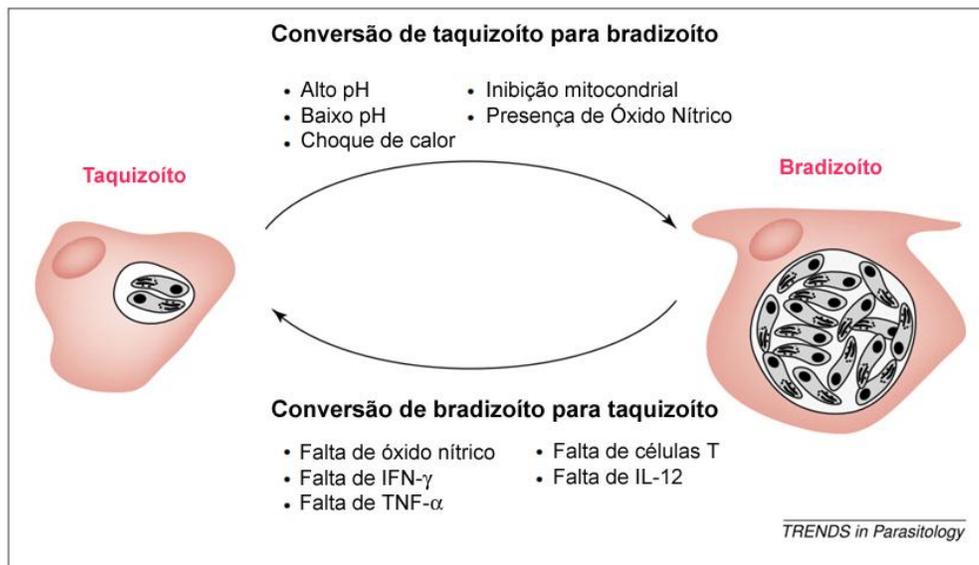
As células infectadas por *T. gondii* são resistentes a indução múltipla de apoptose, incluindo linfócitos T citotóxico (dependente ou independente de Fas), privação IL-2, irradiação gama, irradiação de UV, e ionóforo de cálcio de beauvericina (NASH et al., 1998; LUDER; GROSS, 2005). No entanto, o *T. gondii* inibe a apoptose

da célula hospedeira, incluindo a inibição da liberação do citocromo C da mitocôndria da célula hospedeira, aumentando a expressão de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 e da família da IAP, e interferindo nas pro-apoptóticas, Bax e Bad, além de modular a atividade da quinase reguladora de morte celular, para inibição de caspases, e possível modulação do citocromo C, o qual induz a atividade das caspases 3/7 (HIPPE et al., 2008).

O *T. gondii* parece bloquear a apoptose na célula hospedeira em diferentes pontos e coopta pelas vias sinalizadoras da apoptose da célula hospedeira, em um mecanismo de ambiente sensor (PERSSON et al., 2007).

Vários fatores têm sido relacionados à sua reativação (taquizoíto se transformando em bradizoíto) como apresentado na Figura 4 (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002).

Figura 4 - Fatores associados com interconvenção de taquizoítas e bradizoíta.



Processos de conversão de estágio ou diferenciação é reversível, mesmo com um único hospedeiro é responsável para estabelecer doença crônica associada com bradizoíta. Reativação de doenças está associada com taquizoíta. Abreviações: IFN, interferon; IL: Interleucina; TNF: fator de necrose tumoral

Fonte: Lyons, McLeod e Roberts (2002).

Depois da aquisição de infecção inicial no hospedeiro imunocompetente, o taquizoíta do *T. gondii* rapidamente se converte em bradizoíta para estabelecer uma infecção crônica assintomática (DUBEY et al., 1998). Bradizoítas normalmente não podem ser eliminados pelo hospedeiro devido à resposta imunológica fraca que eles produzem; a eliminação é também difícil devido a sua resistência à eliminação por refratariedade às drogas existentes (GUIMARAES; DE CARVALHO; BARBOSA, 2008). Vários ambientes estressores vão induzir esta conversão, resultando na fosforilação do fator-2 α de iniciação eucariótica do *T. gondii* (TgIF2a), sendo esta fosforilação empregada pela célula para manter o estado latente (NARASIMHAN et al., 2008). O TgIF2a fosforilado no bradizoítas pode ser parte da explicação para a maneira pela qual estes parasitos mantêm seu estado de quiescência na célula hospedeira (NARASIMHAN et al., 2008). Os modelos de conversão do taquizoíta-bradizoíta *in vitro* podem ser alcançados utilizando-se várias condições que mimetizam o estressor imunoderivado, como alto pH (SOETE; CAMUS; DUBREMETZ, 1994), IFN- γ (BOHNE; HEESEMANN; GROSS, 1993), altas temperaturas (SOETE et al., 1994), falta de nutrientes (FOX; GIGLEY; BZIK, 2004), TNF- α , óxido nítrico, ou algumas drogas utilizadas no tratamento da infecção por *T. gondii* (LINDSAY et al., 1991; BOHNE et al., 1993; SOETE et al., 1994; FOX et al., 2004). O estresse induz a elevação de nucleotídeos cíclicos podendo desenvolver um papel importante na conversão do *T. gondii* taquizoítas para bradizoítas (KIRKMAN; WEISS; KIM, 2001). No início da conversão, a expressão de genes taquizoítas tais como, SAG1, SAG2A, SAG2B, LDH1, ENO2, PtdIns (t) e SRS1–SRS3 são desligados e trocados pela expressão de genes específicos de bradizoítas tais como, SAG2C, SAG2D, SAG4, BSR4, MAG1, LDH2, ENO1, BAG1, PtdIns (b) e p-ATPase (LYONS et al., 2002).

Tabela 1 - Proteínas específicas de taquizoíta e bradizoíta

Estágio	Proteína	Refs
Taquizoíta	SAG1	[18]
	SAG2A	[19]
	SAG2B	[19]
	LDH1	[24]
	ENO2	[22]
	PtdIns(t)	[28]
	SRS1-SRS3	[18]
Bradizoíta	SAG2C	[19]
	SAG2D	[19]
	SAG4	[20]
	BSR4	[18]
	MAG1	[21]
	LDH2	[24]
	ENO1	[22]
	BAG1	[15,16]
	PtdIns(b)	[28]
	p-ATPase	[26]

Abreviações: BAG, antígenos de bradizoíta; BSR, recombinante bradizoíta-específico; ENO, enolase; LDH, lactato desidrogenase; MAG, antígeno da matriz; PtdIns, fosfatidilinositol; SAG, antígeno de superfície; SRS, sequencia relacionada à SAG.

Fonte: Lyons et al. (2002).

Embora cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais incluindo pulmões, fígado e rins, eles são mais prevalentes nos tecidos do sistema neural e muscular, como cérebro, olhos, músculo esquelético e cardíaco (DUBEY, 1988).

O período de pré-patente são de 3 a 10 dias após a ingestão do tecido com cisto, ≥ 18 dias após a ingestão de oocisto (DUBEY, 1996) e ≥ 13 dias após a ingestão do taquizoíta (DUBEY, 1996).

Menos de 30% dos gatos liberam oocistos após ingestão com taquizoíta ou oocistos, no entanto praticamente todos os gatos liberam oocistos após a ingestão de cistos (DUBEY; FRENKEL, 1976; DUBEY, 1996).

O desenvolvimento efetivo da resposta celular T CD8⁺ é crucial para o controle de vários patógenos intracelulares, como o *T. gondii* (KHAN; ELY; KASPER, 1994; SCHLUNS; LEFRANCOIS, 2003). Embora ambas as respostas celulares de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ sejam induzidas durante a infecção aguda por *T. gondii*, a proteção, ao

decorrer da vida contra o parasita, é primariamente dependente da subclasse T CD8⁺ (GAZZINELLI et al., 1992). As células T CD8⁺ do hospedeiro infectado por *T. gondii* são importantes fontes de IFN- γ , uma citocina que é primordial para a sobrevivência contra ambas as fases de infecção, aguda e crônica (GAZZINELLI et al., 1992). Além disso, células T CD8⁺ vindo do hospedeiro infectado por *T. gondii* tem a habilidade de exibir *in vitro* atividade citotóxica contra alvos infectados por parasitos (HAKIM et al., 1991). A função citolítica destas células T CD8⁺ antígeno específicas desenvolve um papel importante na manutenção da infecção crônica sob controle (DENKERS et al., 1997).

A diminuição tanto de IFN- γ quanto de células T CD8⁺ reduzem a imunidade protetora contra infecção ao *T. gondii* levando a morbidade ou mortalidade das células do hospedeiro infectado (BHADRA; GUAN; KHAN, 2010). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que IL-7 e IL-15 são exclusivamente importantes para o desenvolvimento da resposta imune celular T CD8⁺ protetora contra *T. gondii*. Também foi sugerido pelos mesmos autores que na ausência de ambas as citocinas IL-7 e IL-15 o desenvolvimento de células T CD8⁺CD127^{hi}Bcl2⁺ é severamente comprometido.

Estudos prévios descreveram que o tratamento exógeno com IL-7 de camundongos infectados com *T. gondii* aumentou a resposta T CD8⁺ contra o parasito resultando em suas habilidades de sobreviver em infecções letais (KASPER; MATSUURA; KHAN, 1995). Os mesmos autores descreveram também que a neutralização de IL-15 endógena compromete a resposta celular de memória T CD8⁺ no animal infectado com *T. gondii* o qual perde sua habilidade de sobreviver ao redesafio.

A expressão de Bcl-2 e IL-7R foi associada com grande sobrevivência o desenvolvimento de células T CD8⁺ frente à infecção de camundongos por *T. gondii* (KAECH et al., 2003). Células de memória precursoras de células efetoras exibem altos níveis de Bcl-2 e podem ser identificados pela expressão de IL-7Ra^{hi} (CD127) (KAECH et al., 2003).

A principal fonte de IL-12 durante a infecção por *T. gondii*, pode ser por células T CD8⁺ e células dendríticas (LIU et al., 2006). De fato, estudo em modelo com camundongos objetivando seletivamente os subtipos de células dendríticas

confirmaram que a maior parte de IL-12 produzida durante a infecção por *T. gondii* com taquizoítos foi produzida por T CD8⁺ e células dendríticas (DCs) (MASHAYEKHI et al., 2011). Na adição de IL-7 em células T humanas *in vitro*, mostrou-se uma regulação para cima da expressão de IFN- γ de maneira de dose dependente (BORGER et al., 1996).

No trabalho de Kim, Fouts e Boothroyd (2007) que pesquisou a modulação de genes de células hospedeiras infectadas com *T. gondii*, foi sugerido que citocinas pró-inflamatórias iniciais produzidas por fibroblastos (fibroblastos – HFF) infectadas por *Toxoplasma gondii* (cepa NTE) podem regular uma grande quantidade de genes responsivos a IFN γ via recrutamento de NF κ B e independentemente de STAT1, e que estes genes não podem ser induzidos através da exposição a IFN γ . Estes mesmos autores sugerem também que o *T. gondii* pode ser capaz de suprimir diretamente um subtipo específico de genes responsáveis a IFN γ . Estes pesquisadores ainda firmam que diferentes cepas de *T. gondii* bloqueiam a expressão de IRF1 induzida por IFN γ , e que este bloqueio seja devido a um defeito na ativação ou na transcrição de STAT1 no núcleo. E por fim descrevem que a translocação nuclear de STAT1 induzida por IFN γ é normal em células infectadas por *T. gondii*, mas não resulta em uma autoindução da expressão de STAT1 e MHC classe II.

A indução por IFN- γ da expressão de MHC classe II na apresentação de antígenos por macrófagos murinos é inibido depois da infecção com *T. gondii* via desligamento funcional na via de sinalização JAK/STAT (LUDER et al., 2001). Além do STAT1 o NF κ B também é modulado pelo *T. gondii* (BUTCHER et al., 2001).

A infecção com *T. gondii* também ativa as vias anti-inflamatórias, incluindo aquelas envolvendo a proteína supressora de sinalização de citocina (SOCS) SOCS1 (STUTZ et al., 2012) e SOCS3 (WHITMARSH et al., 2011) e STAT3 (BUTCHER et al., 2005).

Proteína ligante da sequência consenso de interferon ou fator regulatório de interferon do tipo 1 (IRF1) é um fator transcricional que está sob o controle de STAT1 e

não pode ser induzido por IFN γ em células STAT1^{-/-} (GIL et al., 2001). Camundongos IRF1 *knockout* são extremamente suscetíveis ao *T. gondii* (SILVA et al., 2002a).

1.1.1 Toxoplasma gondii: sintomas e doenças

Os efeitos maléficos da toxoplasmose latente na saúde e no comportamento humano incluem meningoencefalites, mudanças de personalidade, diminuição do quociente de inteligência, redução do desempenho psicomotor e distúrbios neuropsicológicos, como esquizofrenia (WEBSTER et al., 2006; FLEGR, 2007).

Segundo Yolken et al. (2009) dos 54 trabalhos que abordaram a relação entre esquizofrenia e toxoplasmose 49 encontraram que pessoas com esquizofrenia têm concentrações elevadas de IgG positivo para toxoplasmose. Desta forma pessoas IgG positivas para *T. gondii* podem ter um fator de risco maior para esquizofrenia (YOLKEN et al., 2009). Além disso, afirmaram que havia pelo menos duas áreas nas quais o fator epidemiológico é diferente: a familiar e os aspectos genéticos. Sendo que inúmeros destes estudos afirmaram que a esquizofrenia ocorre com riscos de até 10 vezes mais para indivíduos de primeiro grau de parentesco quando comparados à pessoas que tenham a doença. No entanto, nenhum destes estudos provou a relação genética com a esquizofrenia, abrindo uma possibilidade que ela seja cultural, comportamental e ambiental, uma vez que indivíduos com algum grau de parentesco geralmente tem algum destes fatores muito próximos.

A respeito da toxoplasmose congênita foi descrito por Piekarski (1981) e Witting (1979) que camundongos e ratos infectados com *T. gondii* tem dificuldade no aprendizado e na memória. Já no trabalho de Havlicek et al. (2001) foi encontrado que em indivíduos infectados com *T. gondii* perdem a concentração mais fácil que os não contaminados. Além disso, os infectados têm duas vezes mais probabilidade de terem acidentes de carros que os que não são (FLEGR et al., 2002). Indivíduos com evidência sorológica para *T. gondii* tem um tempo menor de resposta de memória definitiva e imediata (YOLKEN et al., 2009).

O estudo de Flegr et al. (1996) encontrou uma correlação positiva entre a duração da toxoplasmose latente e a diminuição da intensidade da força do superego

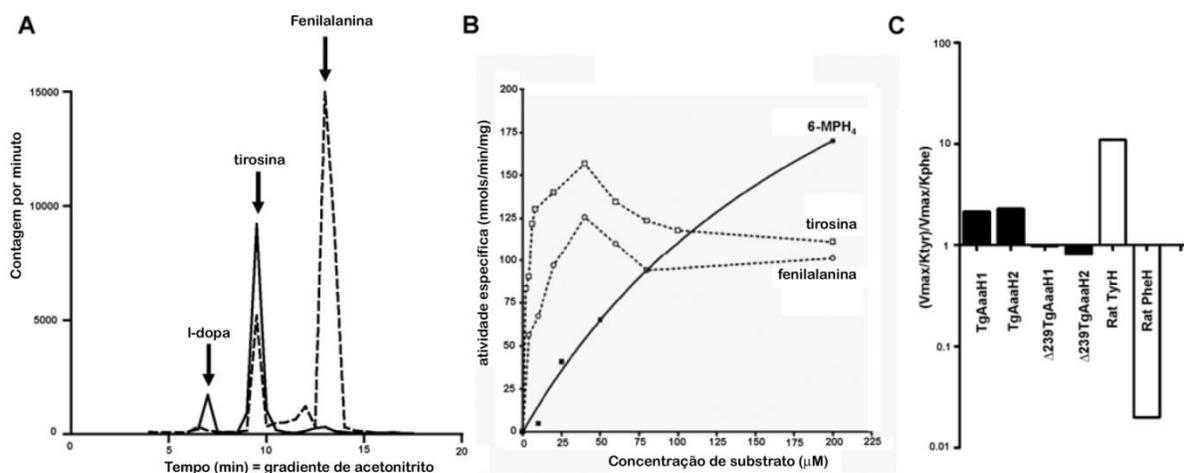
($P < 0,02$) sugerindo que o decréscimo da força do superego (a disposição para aceitar padrões morais de grupos) foi induzida pela infecção de *T. gondii*. O mecanismo mais provável pelo qual o *T. gondii* poderia causar esquizofrenia é afetando neurotransmissores em áreas do cérebro conhecidas por estarem envolvidas com esquizofrenia (YOLKEN et al., 2009). Sendo que estudos demonstraram que indivíduos com esquizofrenia têm evidências de aumento de neurotransmissores, especialmente ácido gama-amino butírico (GABA), glutamato e dopamina (YOLKEN et al., 2009).

Hospedeiros infectados com *T. gondii* exibem mudanças tanto na expressão de receptores cerebrais dopaminérgicos e ansiogênicos, quanto em nível de neurotransmissores, tais como dopamina, e concentrações de noradrenalina (norpinefrina) e testosterona (SKALLOVA et al., 2006; WEBSTER et al., 2006; FLEGR, 2007). Stibbs (1984), que também pesquisou sobre outros parasitos, deu maior atenção no *T. gondii*, devido a sua habilidade em alterar aprendizagem, memória e comportamento de camundongos e ratos infectados. Seus estudos comprovaram que há um aumento (14%) de dopamina em camundongos crônicos infectados com *T. gondii*. Assim, Stibbs (1985) inferiu que o *T. gondii* causa anormalidades no metabolismo de catecolaminas e estas, podem contribuir para as mudanças psicológicas e motoras vistas especialmente em roedores.

Skallová et al. (2006) afirmaram que as mudanças comportamentais de camundongos foram, provavelmente, por causa do sistema dopaminérgico. Pouco tempo depois Gaskell et. al. (2009) encontrou no genoma do *T. gondii* dois genes que codificam tirosina hidroxilase (enzima produtora de DOPA), sendo TgAaaH1 constitutivamente expresso, enquanto o TgAaaH2 é induzido durante a formação do bradizoíta (Figura 5), que é um fator limitante na geração de dopamina contida no cérebro devido a uma menor afinidade por tirosina que a forma TgAaaH1. Análises funcionais verificaram que a atividade enzimática desta enzima é induzida durante a diferenciação na forma bradizoíta, sugerindo assim, um mecanismo pelo qual o toxoplasma pode modificar o comportamento do hospedeiro pela modulação contida no cérebro (GASKELL et al., 2009). Neste mesmo trabalho é sugerido que a tirosina hidroxilase representa uma característica de cistos teciduais que formam, exclusivamente, *T. gondii* e *N. caninum*. Estes autores localizaram a enzima na

membrana do parasito e no vacúolo parasitóforo, mas sugerem a necessidade de mais experimentos para esta informação. Sugerem também que a L-DOPA pode estar envolvida na constituição da membrana que forma o cisto do parasito. Dois anos mais tarde, um estudo do mesmo grupo, comprovou que o *T. gondii* pode alterar diretamente a sinalização de dopamina, produzindo e liberando-a para a célula neuronal, e assim, mediando mudanças de comportamento do hospedeiro, o que pode estar relacionado a desordens psíquicas, como por exemplo a esquizofrenia (PRANDOVSKY et al., 2011).

Figura 5 - TgAaaH 1 e 2 codificam tirosina hidroxilase com substrato não usual específico



A - Rastreo por HPLC da produção de tirosina e L-DOPA por enzimas recombinantes. As frações foram coletadas e monitoradas por radiomarcagem através de contagem de cintilações. Marcas internas de fenilalanina, tirosina, e L-DOPA são marcadas com setas. B - Gráfico mostrando a catalise de tirosina e fenilalanina em relação à concentração de substato. O substrato são tirosina (0-200 mM) e fenilalanina (0-200mM). A dependência do análogo 6-MPH₄ da tetrahydrobiopterina sobre uma faixa de concentração é também mostrado com tirosina (50mM) como substrato. C - Catálise relativa de tirosina e fenilalanina revela preferência do substrato. A taxa de reação e o K dos substratos foram medidos e as taxas são mostradas. A taxa de 1 indica sem especificidade de substrato. A taxa menor que 1 indica uma preferência para fenilalanina como substrato ; demonstrado pela inclusão da fenilalanina hidroxilase rat (DAUBNER; HILLAS; FITZPATRICK, 1997). Uma taxa maior que 1 indica uma preferência da tirosina como demonstrado pela inclusão de fenilalanina hidroxilase rat.

Fonte: Gaskell et al., (2009).

1.1.2 Infecção por Toxoplasma gondii e mecanismos de evasão imune da célula

A invasão o *T. gondii* induz uma forte resposta imunológica mediada por célula e IFN- γ em seus hospedeiros mamíferos para resistir à infecção aguda e manter a infecção latente (SUZUKI; CONLEY; REMINGTON, 1989). Assim, a principal forma que o *T. gondii* tem para modular a resposta imune mediada por células é a habilidade de evadir pela ação do IFN- γ bloqueando a atividade transcricional do STAT1 (ZIMMERMANN et al., 2006; KIM et al., 2007). Além disso, pode também diminuir a fosforilação de tirosina do STAT1 (ZIMMERMANN et al., 2006). Por exemplo, células hospedeira infectadas por *T. gondii* são significativamente menos responsivas ao aumento da indução por muitos genes tais como, IFN- γ , incluindo MHC classe II, iNOS, e a p47 GTPases (LANG et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2006; KIM et al., 2007).

1.1.3 Susceptibilidade ao Toxoplasma gondii

A virulência nos camundongos é devido à cepa de *T. gondii* específica, em que os clones do tipo I são universalmente virulentos, clones do tipo II são intermediamente virulentos, e clones do tipo III são a virulentos (GIGLEY; FOX; BZIK, 2009).

Células T CD8+ e interferon gama (IFN- γ) são efetores significativos em mediar a resistência para a infecção aguda e crônica ao *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1992). Células T CD8+ produzidas em resposta à vacinação de cps1-1 (cepa modificada não-replicante do tipo I de *T. gondii*, que exibe severa auxotrofia de uracila) postergam ou previnem o agravamento de cistos cerebrais em camundongos C57BL/6 (B6) infectados cronicamente (GIGLEY et al., 2009).

Os camundongos C57BL/6 são mais susceptíveis a infecção pela cepa ME49 de *T. gondii* do que C3H/HeN e BALB/c, sendo um bom modelo animal para encefalite causada por *T. gondii* (SUZUKI; YANG; REMINGTON, 1995).

Um trabalho que focou na vacinação para *T. gondii* encontrou que camundongos geneticamente suscetíveis C57BL/6 (B6) para tipo de cepa I pode prevenir o desenvolvimento de infecção crônica letal (GIGLEY et al., 2009). Em modelo murino de toxoplasmose, espécies de camundongos resistentes (BALB/c) estabelecem uma

infecção latente crônica e espécies susceptíveis (C57BL/6) desenvolvem encefalite necrosante em estágios tardios da infecção (LIESENFELD et al., 1996).

O aumento da suscetibilidade de camundongos MIF^{-/-} ao *T. gondii* foi associado com indução pobre de IL-12, TNF α e IL-1 β em estágios precoces de infecção e com o aumento da carga parasitária no cérebro (FLORES et al., 2008).

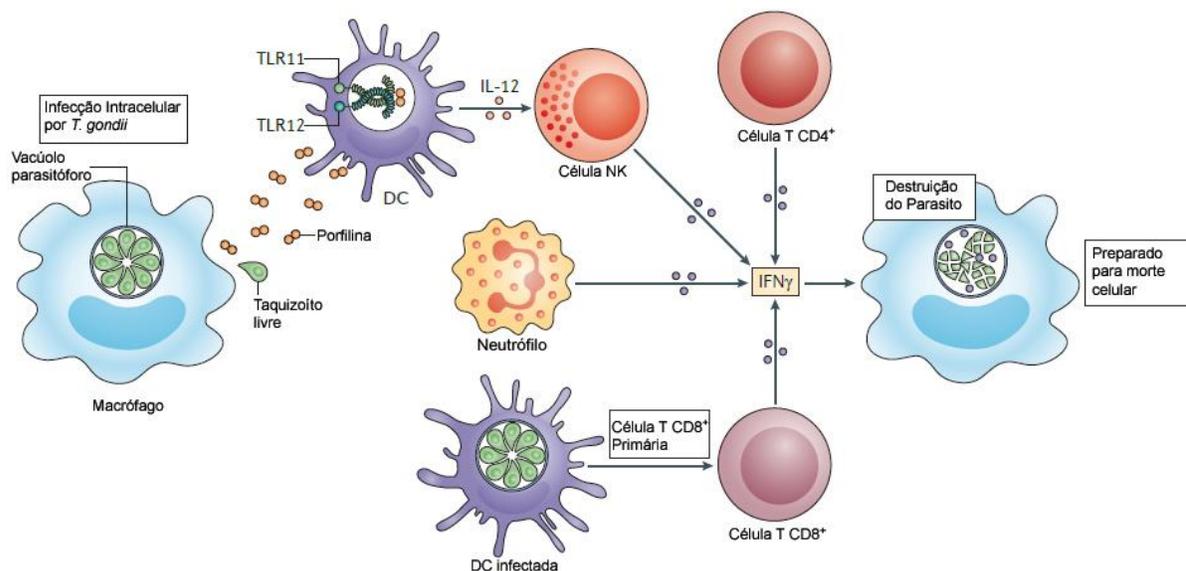
Contribuições importantes são mediadas pela imunidade inata através de células epiteliais, NK, NKT, e enterócitos intraepiteliais contidos na lâmina própria (BUZONI-GATEL et al., 2006). Nam, Ahn e Yang (2011) encontraram que células dendríticas esplênicas mostraram mudanças precoces e rápidas de citocinas, podendo ter um importante papel protetor na fase precoce de toxoplasmose em murinos.

Várias populações celulares, incluindo células dendríticas (DCs), macrófagos e neutrófilos (GAZZINELLI et al., 1994; REIS E SOUSA et al., 1997; BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000), são células imune muito importantes que respondem adequadamente a infecção por *T. gondii*, assim como ao seu antígeno solúvel (STAg), produção de interleucina 12 (IL-12) (ALIBERTI; SHER, 2002). Sendo que as DCs são as maiores produtoras de IL-12 durante infecção por *T. gondii* (LIU et al., 2006). A resposta de IL-12 das DCs ao *T. gondii* é extremamente rápida, com pico em algumas horas, e excede a maioria dos observados com outros estimuladores da produção de IL-12 microbianos. Assim, esta resposta é crucial para elucidar uma outra que é a resposta imune dependente de IFN γ contra *T. gondii* (BOURGUIN et al., 1998; ALIBERTI; SHER, 2002).

Em recente revisão, que focou sobre os mecanismos imunes inatos que são essenciais para proteção, mediada por IFN γ , do hospedeiro contra o *T. gondii*, afirmou-se que dentre os receptores tipo TOLL (TLRs) o principal para a resposta inata a este parasito é o TLR do tipo 11 (TLR11) (YAROVINSKY, 2014). A ativação de MYD88 em células dendríticas promove a produção de IFN γ a partir de células naturais killers (NK), mas não a partir das células T (HOU et al., 2011). Além disso, a sinalização em células dendríticas, mas não em outras células, é essencial pela produção precoce por células NK, mas a sinalização MYD88 intrínseca de células T regula a produção de IFN γ por

células T CD4⁺ (YAROVINSKY, 2014). Estas inter-relações são abordadas nas Figura 6 e 7 formulados por Yarovsky (2014).

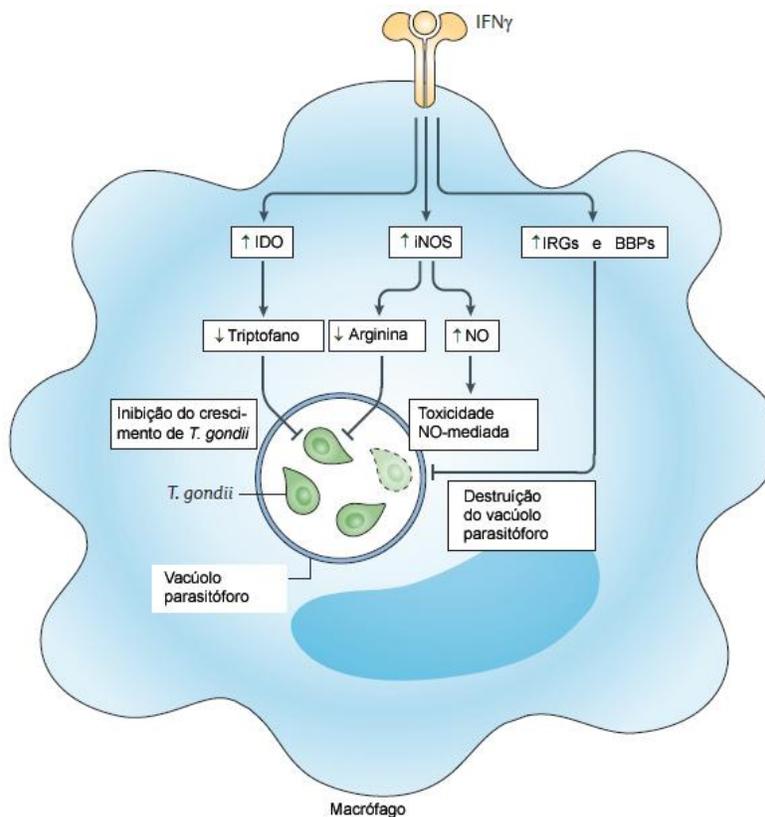
Figura 6 - Fontes celulares de IFN γ durante a infecção por *T. gondii*



Interferon- γ (IFN- γ) é crucial para sobrevivência durante a infecção por *Toxoplasma gondii*. Produção desta citocina pelas células assassinas naturais (NK) é dependente do reconhecimento mediado pelo receptor similar ao Toll (TLR11) da porfilina pelas células dendríticas (DCs). Tanto o IFN γ derivado da célula T CD4⁺ quanto da T CD8⁺ são essenciais para resistência ao *T. gondii* durante o estágio crônico da infecção, mas a sinalização de TLR é dispensável para esta produção de IFN γ vinda de células T. Como alternativa, a diferenciação mielóide intrínseca de células T CD4⁺ responsáveis primariamente à via da proteína 88 (MYD88) regula a resposta celular T auxiliar 1 (Th1) ao parasito, e a ativação de células T CD8⁺ é mediada por antígenos de *T. gondii* que são expressos em DCs infectadas. Neutrófilos fornecem uma importante fonte inata de IFN γ ; o mecanismo que regula o IFN γ derivado de neutrófilo não são bem entendidos porque esta IFN γ não é regulado por TLRs ou interleucina-12 (IL-12).

Fonte: Yarovsky (2014)

Figura 7 - Mecanismo efetor mediado pelo IFN γ na eliminação do parasito em células infectadas



Interferon- γ (IFN γ) tem efeitos pleotróficos na infecção celular e resulta na redução da replicação do parasito pela indução da expressão da proteína inibitória indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), assim como a expressão da proteína efetora GTPase relacionada a imunidade (IRGs) e das proteínas ligantes de guanilato (GBPs). IDO degrada triptofano, o qual é um aminoácido essencial para o crescimento do *T. gondii*. Em adição, a iNOS produz um metabólito de alta toxicidade, o óxido nítrico (NO), que restringe a replicação do parasito pela depleção de arginina, a qual é outro aminoácido essencial para o crescimento do *T. gondii*. IRGs e GBPs são responsáveis para a destruição do vacúolo parasitóforo, o qual é uma organela especial que contém o *T. gondii* que protege ele do mecanismo endossomal da eliminação do micróbio. Uma vez que o vacúolo parasitóforo é danificado, os parasitos *T. gondii* ficam vulneráveis para rápida eliminação do citoplasma de células infectadas. O mecanismo efetor induzível pelo IFN γ são diferentemente expressos em vários tipos celulares, mas a expressão do receptor de IFN γ tanto em células derivadas da medula óssea quanto de células estromais é essencial para proteção do hospedeiro, uma vez que *T. gondii* pode infectar qualquer célula nucleada.

Fonte: Yarovsky (2014)

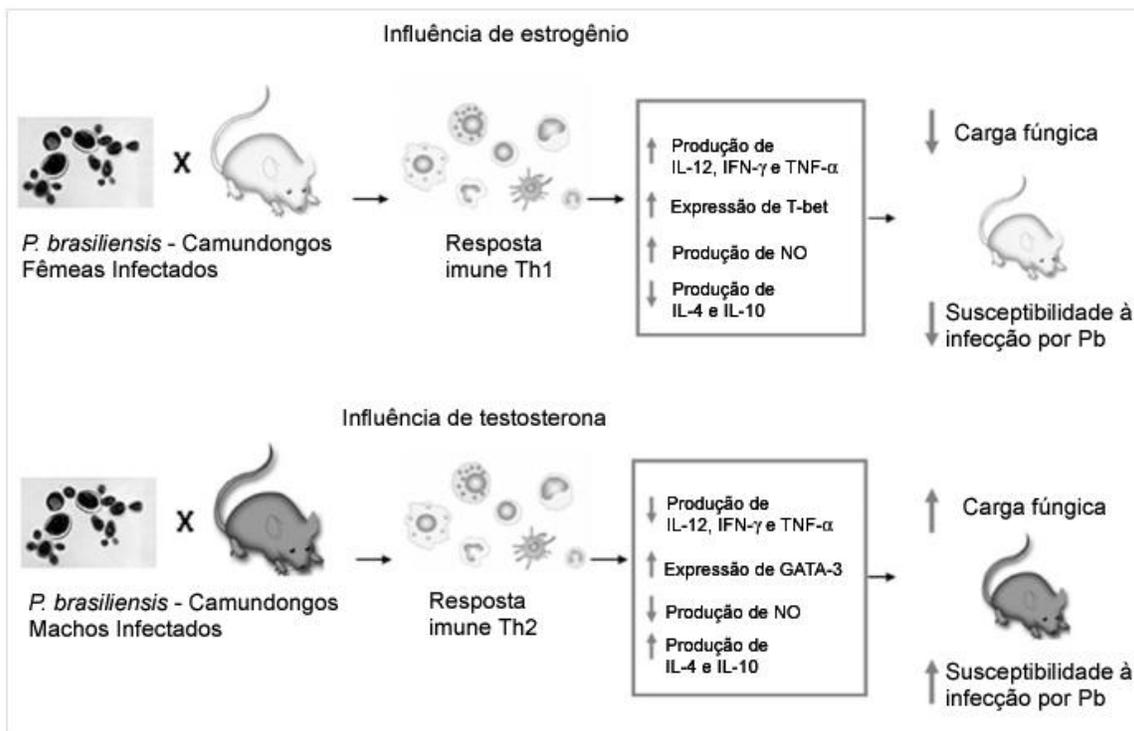
A pesquisa de Terrazas et al. (2010), que abordou a relação entre várias cepas de *T. gondii* em camundongos *knockouts* para fator inibitório de migração de macrófago (MIF), concluiu que a falta de maturação e produção de IL-12 pelas DCs em resposta a antígenos de *T. gondii* ficou confirmada em estudos *in vitro*, e estes efeitos foram reversíveis seguindo o tratamento com MIF recombinante. Assim, os mesmos autores afirmaram que MIF é crucial tanto na maturação precoce das DCs, quanto na produção de IL-12 produzidas por elas (TERRAZAS et al., 2010).

No início do processo infeccioso, leucócitos CD11c⁺ e CD11b⁺, presentes no intestino de animais infectados, são infectados e identifica-se que células CD11b estão envolvidas na disseminação para sítios distantes do local, incluindo o cérebro (COURRET et al., 2006). E que as células CD11b estão presentes em granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

1.1.4 Toxoplasma gondii e sua relação com o gênero

Diversos estudos deixaram bem estabelecido que os homens são afetados mais precocemente que as mulheres (YOLKEN et al., 2009). Por isso pesquisas relacionadas à concentração plasmática de testosterona têm tido maior ênfase na literatura, uma vez que este hormônio é o principal andrógeno circulante e seus níveis diminuem com o envelhecimento em homens (ARAUJO et al., 2004; CHEN; GE; ZIRKIN, 2009). O hormônio testosterona também tem sido relacionado à modulação do sistema imune para o perfil Th2 (PINZAN et al., 2010). A figura 8 denota a influência de hormônios (estrogênio e testosterona) no desencadeamento de um tipo de perfil imunológico, sendo o estrogênio ligado a Th1 e a testosterona ligada ao Th2.

Figura 8 - Papel provável de hormônios no curso da infecção por *P. brasiliensis*



Machos e fêmeas foram infectados com células fúngicas de *P. brasiliensis* e vários eventos da resposta imunológica montados para ambos os sexos de camundongos são mostrados nesta figura.

Fonte: Pinzan et al. (2010)

No trabalho de Sato et al. (2014), observou-se que o treinamento resistido progressivo restabelece a diminuição de enzimas esteroideogênicas sexuais e dos níveis de hormônios esteroides musculares relacionados ao sexo em homens senis.

Estudos que abordam o envelhecimento em animais de experimentação, especialmente os camundongos C57BL/6, têm sido realizados nos últimos anos e com a necessidade de se estabelecer equivalências entre as fases da vida destes animais com os seres humanos buscando parâmetros confiáveis (BALLAK et al., 2014). No que se refere ao mecanismo de resistência pré-imune de camundongos, tem-se indícios que o envelhecimento seja responsável pelo aumento da susceptibilidade ao *Toxoplasma gondii*, uma vez que camundongos idosos comparados com jovens foram

mais susceptíveis após a infecção cística via oral ou peritoneal (JOHNSON; GIBSON; SAYLES, 1995).

Uma possível explicação para a maior incidência de esquizofrenia em homens em idade precoce poderia ser que a testosterona confere de alguma maneira risco para esta doença (MARKHAM, 2012).

O trabalho de Pinzan et al. (2010), que comparou o perfil imunológico de machos normais, machos castrados, fêmeas normais e fêmeas tratadas com testosterona (Figura 8), mostrou que machos normais e fêmeas tratadas com testosterona tinham um perfil Th2, e que machos castrados e as fêmeas normais apresentavam um perfil Th1. Sendo que concentrações maiores de testosterona se correlacionaram positivamente com a produção de IL-10, expressão de mRNA de IL-4 e de GATA-3, e correlaciona-se negativamente com IFN- γ , IL-12, TNF- α e NO (PINZAN et al., 2010).

Shirahata et al. (1992), mostrou existir em fêmeas grávidas uma correlação entre o aumento da susceptibilidade da infecção primária de *T. gondii* à uma diminuição da produção de IFN- γ . Kaňková, Kodym e Flegr (2011) encontraram um decréscimo da concentração plasmática de testosterona em ambos os sexos quando os animais estavam infectados com *T. gondii*, sugerindo assim, a existência de um mecanismo adaptativo dos camundongos infectados que objetivam compensar a imunossupressão induzida pelo parasito durante a infecção latente. Por outro lado, no trabalho de revisão de Flegr (2013) é discutido que muitos experimentos apresentaram aumento das concentrações de testosterona relacionado à infecção por *T. gondii*. Desta forma, embora pareça não haver um consenso na literatura sobre a influência do *T. gondii* na modulação da produção de testosterona do hospedeiro (ABDOLI; DALIMI; MOVAHEDIN, 2012), os achados relacionando a modulação da produção aumentada de testosterona em animais infectados têm sido fundamentados (LIM et al., 2013; VYAS, 2013).

A modulação da testosterona na diminuição das imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG) foi bem documentada, apontando-se que em células humanas mononucleadas de sangue periférico (PBMC) este efeito pode ser mediado indiretamente pela inibição da

testosterona na produção de IL-6 derivada de monócitos (KANDA; TSUCHIDA; TAMAKI, 1996). Em cachorros machos a expressão de receptor de androgênio (AR) foi menor nos mais velhos comparados aos mais jovens (OHNO et al., 2013). Isso sugere que não só a concentração de testosterona seja importante, mas a do receptor tem sua relevância.

1.2 Sedentarismo

O sedentário pode ser definido como o indivíduo que realiza de 20 a 150 min/semana de atividades físicas (BENNETT et al., 2006).

Antes de discorrermos sobre exercício físico é importante esclarecer que sua falta é um fator de risco a ser considerado nas epidemias atuais. O sedentarismo e a obesidade são os principais fatores para o processo de senilidade (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008) que está correlacionada ao aumento de susceptibilidade ao *T. gondii* (GARDNER; REMINGTON, 1978a;1978b; JOHNSON et al., 1995).

O sedentarismo e a obesidade juntos desregulam o sistema imunológico, aumentando a probabilidade de aparecimento de doenças, tais como: Diabetes mellitus do tipo 2, diferentes tipos de cânceres, desordens psíquicas e doença aterosclerótica (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008). A pesquisa de hamilton, M. T.; hamilton, D. G.e Zderic (2007), muito pertinente, trabalhou com estes dois aspectos da sociedade atual, a influência do baixo gasto energético e o prolongado tempo que os indivíduos ficaram sentados, correlacionando-os com seus fatores de risco para doenças como: obesidade, síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Neste estudo concluí-se que há necessidade em se aumentar o gasto energético diário de forma maciça, principalmente reduzindo a quantidade de tempo que um indivíduo fica sentado.

Em relação à expressão de genes ligados ao exercício, afirmou-se que aqueles que têm sua expressão aumentada durante a falta de carga/inatividade, serão mais resistentes para recarga/atividade do que aqueles genes que são têm sua expressão diminuída (BEY et al., 2003). Portanto, ao se comparar com normal e espontâneo, ficar

em pé ou andar vagorosamente, assim como ficar em curtos períodos de imobilidade, reprimem ou estimulam a expressão de vários genes (BEY et al., 2003).

1.3 Exercício físico

A atividade física regular está intrinsecamente ligada a uma boa saúde. Nesta perspectiva pode-se verificar que várias instituições ligadas à saúde recomendam a prática de atividade física regular (POLLOCK et al., 2000; FLETCHER et al., 2001; US, 2001; PESCATELLO et al., 2004; US, 2004; HASKELL et al., 2007; NELSON et al., 2007; CANADA, 2009; CHODZKO-ZAJKO et al., 2009; MCGUIRE, 2011). Sendo que o trabalho de Fletcher et al. (2001) foi o único que não se pronunciou a respeito atividade física de força e nem a recomendou. Pollock et al. (2000) não recomendou a atividade física aeróbica. E os autores (FLETCHER et al., 2001; PESCATELLO et al., 2004; US, 2004; HASKELL et al., 2007) não reportaram sobre alongamento e equilíbrio. Mas a grande maioria dos autores citados acima, oito publicações, recomendou ao mesmo tempo atividade física aeróbica e resistida para se alcançar um benefício físico específico ou geral (POLLOCK et al., 2000; US, 2001; PESCATELLO et al., 2004; US, 2004; HASKELL et al., 2007; NELSON et al., 2007; CANADA, 2009; CHODZKO-ZAJKO et al., 2009; MCGUIRE, 2011). A Organização Mundial de Saúde (OMS), com base nesses estudos já citados, fez recomendações sobre exercícios físicos regulares, e para todas as idades (WHO, 2010).

Exercícios aeróbicos e de força são recomendados para todos os adultos acima de 18 anos, sendo que para os idosos recomenda-se ainda exercícios de equilíbrio e alongamento (WHO, 2010). Assim, tendo como base a literatura já citada que recomenda exercícios físicos para manter ou melhorar a saúde de diferentes grupos de pessoas, pode-se afirmar que a prática regular de exercícios físicos é de fundamental importância para uma boa saúde. No entanto, nas diversas literaturas pesquisadas, não se encontraram dados sugerindo qualquer tipo de atividade física para grupos de pessoas infectadas com algum parasito.

Evidências experimentais tanto de animais quanto de humanos dão suporte aos efeitos benéficos de exercício na função cognitiva. A atividade física promove um melhor desempenho no aprendizado, na preservação da memória (FORDYCE;

WEHNER, 1993; KRAMER et al., 1999), facilita a recuperação após injúria cerebral (GREALY; JOHNSON; RUSHTON, 1999) e combate o declínio mental associado com a senescência (LAURIN et al., 2001). Além disso, em especial, o exercício físico regular melhora o sistema imunológico em diferentes aspectos (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b) e, portanto faz-se necessária implementação do estudo da imunologia do exercício em todos os currículos para formação de profissionais em educação física (SHEPHARD, 2010; BORTOLINI; REIS; MINEO, 2013) que irão prescrever a outrem estes exercícios físicos.

1.3.1 Tipos de exercício

Desde a antiguidade já eram descritas definições de exercício físico, sendo que a mais antiga foi encontrada em livros antigos na Índia e data de 1.500-1.000 aC e o define como "Qualquer ação física a qual é desejada e capaz de trazer a estabilidade ao corpo e força é conhecida como um exercício físico" (SHARMA; DASH, 2008). Esta definição, que pode ser considerada moderna, é provavelmente a primeira definição mundial de exercício físico, do mais antigo registro mundial de "práticas medicinais" (ou em indiano "Atreya Samhita" (SHARMA; DASH, 2008). Além dessa descrição a atividade física também pode ser definida como qualquer movimento corporal produzido pelo músculo esquelético que requer gasto de energia (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985; WHO, 2014).

Caspersen et al. (1985) relata sobre os componentes ligados às capacidades físicas que:

- a) estão ligados à capacidade relacionada à saúde (resistência cardiorrespiratória, resistência muscular, força muscular, composição corporal e flexibilidade);
- b) assim como à capacidade relacionada à habilidade (agilidade, equilíbrio, coordenação, velocidade, força e tempo de reação).

No quadro 1, a seguir podemos verificar as diferenças sugeridas por Caspersen, Powell e Christenson (1985) entre atividade física e exercício físico.

Quadro 1 - Elementos de atividade física e exercício

Atividade Física	Exercício Físico
1. Movimento corporal via músculo esquelético.	1. Movimento corporal via músculo esquelético.
2. Resulta no gasto de energia.	2. Resulta no gasto de energia.
3. Gasto de energia (quilocalorias) varia continuamente do baixo para o alto.	3. Gasto de energia (quilocalorias) varia continuamente do baixo para o alto.
4. Positivamente correlacionado com capacidade física.	4. Muito positivamente correlacionado com capacidade física.
	5. Movimentos corporais repetitivos planejados e estruturados.
	6. Objetiva melhorar ou manter um componente da capacidade física.

Fonte: Caspersen; Powell; Christenson (1985).

A mais simples categorização identifica a atividade física que ocorre durante o sono, no trabalho, e no lazer, como é demonstrado na fórmula abaixo (MONTTOYE, 1975):

$$\text{kcal}_{\text{sono}} + \text{kcal}_{\text{trabalho}} + \text{kcal}_{\text{lazer}} + \text{kcal}_{\text{serviços caseiros}} + \text{kcal}_{\text{outros}} = \text{kcal}_{\text{atividade física}}$$

Nesta fórmula é apresentada a contribuição de calorias de cada categoria para o gasto total de energia, exceto o efeito termogênico induzido pela dieta (o qual é o gasto de energia acima da taxa metabólica no estado de descanso), sendo que a atividade física esta acima da taxa metabólica basal, e não inclui (JEQUIER, 1983).

Para podermos trabalhar com atividades físicas e suas capacidades é importante saber diferenciá-las e para isso Caspersen, Powell e Christenson (1985) fizeram um sumário com os termos mais utilizados (Quadro 2):

Quadro 2 - Termos de Glossário

TERMOS DE GLOSSÁRIO

Agilidade - Um componente relacionado à habilidade da capacidade física que se relaciona à habilidade para mudanças rápidas de posicionamento do corpo inteiro no espaço com velocidade e precisão.¹

Atividade Física - A atividade física pode ser definida como qualquer movimento corporal produzido pelo músculo esquelético que requer gasto de energia.²

Capacidade Física - um conjunto de atributos que as pessoas têm ou adquirem que se relaciona à habilidade de realizar atividade física.²

Composição corporal - Um componente relacionado à saúde de capacidade física que se relaciona às quantidades relativas de músculo, gordura, osso e outras partes vitais do corpo.¹

Condicionamento - Um componente relacionado à habilidade de capacidade física que se relaciona à habilidade de utilizar-se os sentidos, tais como a visão e audição, juntas com as partes corporais na execução das tarefas motoras de forma harmoniosa e precisa.¹

Equilíbrio - Um componente relacionado à habilidade de capacidade física que se relaciona à manutenção do equilíbrio durante a fase estacionária ou de movimento.¹

Exercício - movimentos feitos pelo corpo de forma repetitiva, planejada e estruturada para melhorar ou manter um ou mais componentes da capacidade física.²

Flexibilidade - Um componente relacionado à habilidade de capacidade física que se relaciona à faixa permitida de movimento nas juntas.¹

Força - Um componente relacionado à habilidade de capacidade física que se relaciona à taxa na qual alguém pode realizar trabalho.²

Força muscular - Um componente relacionado à saúde da capacidade física que se relaciona à uma quantidade de força externa que um músculo pode exercer.¹

Resistência muscular - Um componente relacionado à saúde da capacidade física que se relaciona à habilidade dos grupos musculares em exercer força externa por muitas repetições ou exercícios sucessivos.¹

Resistência cardiorrespiratória - Um componente relacionado à saúde de capacidade física que se relaciona à habilidade dos sistemas circulatório e respiratório para o fornecimento de combustíveis durante a realização da atividade física e para eliminar a produção de fadiga após o fornecimento de combustível.¹

Tempo de reação - Um componente relacionado à habilidade de capacidade física que se relaciona ao tempo decorrido entre a estimulação e o início da reação.¹

Velocidade - Um componente relacionado à habilidade de capacidade física que se relaciona à habilidade para realizar um movimento em um curto período de tempo.¹

¹De Corbin, Charles B., et al., Concepts in physical education with laboratories and experiments, 4th ed. © 1970, 1974, 1978, 1980 Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA. All Rights Reserved. Adapted by special permission by ²Caspersen; Powell; Christenson (1985).

A diferenciação da intensidade é muito importante entre os exercícios, uma vez que elas estão implicadas em várias funções físió-imuno-endócrino-patológicas (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b). Desta forma Howley (2001) sugeriu que a intensidade da atividade física (Tabela 2) e dos trabalhos ocupacionais (Tabela 3) fossem controlados de acordo com o modelo apresentado em cada uma.

Tabela 2 - Classificação da intensidade da atividade física

Classificação da intensidade da atividade física

Intensidade	Atividades Tipo de Resistência										Exercício tipo Resistido	
	Intensidade Relativa			Intensidade (METs e % $\dot{V}O_{2max}$) em Adultos Saldáveis, Diferem em $\dot{V}O_{2max}$								Intensidade Relativa
	% $\dot{V}O_{2R}^a$	%HR _{max} ^b	RPE ^c	$\dot{V}O_{2max} = 12$ METs		$\dot{V}O_{2max} = 10$ METs		$\dot{V}O_{2max} = 8$ METs		$\dot{V}O_{2max} = 5$ METs		%1RM ^e
%HRR			METs	% $\dot{V}O_{2max}^d$	METs	% $\dot{V}O_{2max}$	METs	% $\dot{V}O_{2max}$	METs	% $\dot{V}O_{2max}$		
Muito Leve	<20	<50	<10	<3.2	<27	<2.8	<28	<2.4	<30	<1.8	<36	<30
Leve	20–39	50–63	10–11	3.2–5.3	27–44	2.8–4.5	28–45	2.4–3.7	30–47	1.8–2.5	36–51	30–49
Moderado	40–59	64–76	12–13	5.4–7.5	45–62	4.6–6.3	46–63	3.8–5.1	48–64	2.6–3.3	52–67	50–69
Difícil	60–84	77–93	14–16	7.6–10.2	63–85	6.4–8.6	64–86	5.2–6.9	65–86	3.4–4.3	68–87	70–84
Muito Difícil	≥85	≥94	17–19	≥10.3	≥86	≥8.7	≥87	≥7.0	≥87	≥4.4	≥88	≥85
Máximo	100	100	20	12	100	10	100	8	100	5	100	100

Modificado da tabela 1 do Posicionamento Padrão da ACSM (ref. 5).

^a % $\dot{V}O_{2R}$ - porcentagem de captação de oxigênio reserva; %HRR - porcentagem de batimento cardíaco reserva.

^b %HR_{max} = 0.7305 (% $\dot{V}O_{2max}$) + 29.95 (ref. 20); valores baseados em grupos de 10-MET

^c Taxa de Borg da porcentagem de extração 6–20 scale (ref. 8).

^d % $\dot{V}O_{2max}$ = [(100% - % $\dot{V}O_{2R}$) MET_{max}⁻¹] + % $\dot{V}O_{2R}$; Comunicação pessoal (D. P. Swain, 2000).

^e RM = repetição máxima, o maior peso que pode ser movido uma única vez de forma completa.

Fonte:Howley (2001)

Tabela 3 - Intensidade de trabalho ocupacional

Intensidade de trabalho ocupacional		
Intensidade	Gasto de Energia (kJ·min ⁻¹)	Gasto de Energia (METs)
Sedentário	<8.4	<1.9
Leve	8.4–14.7	1.9–3.3
Moderado	14.8–20.9	3.4–4.7
Pesado	21.0–31.4	4.8–7.1
Muito pesado	>31.4	>7.1

De Bouchard e Shephard (I) baseado nos dados de Brown e Crowden (II). Valores MET baseado em média de peso corporal de 63 kg, de Brown e Crowden (II).

Fonte: Howley (2001)

1.3.1.1 Exercício resistido

Por definição, o termo treinamento resistido refere-se ao método especializado de condicionamento que envolve o uso progressivo de uma grande faixa de cargas resistidas e uma variedade de modalidades de treinamentos feitos para evidenciar saúde e/ou capacidade física e/ou esportes de rendimento (FAIGENBAUM et al., 2009). Embora o termo treinamento resistido seja utilizado como, treinamento de força e/ou treinamento de peso e estes sejam algumas vezes empregados como sinônimos, o termo treinamento resistido engloba uma diversidade de modalidades de treinamento e abrange uma ampla gama de objetivos de treinamento (FAIGENBAUM et al., 2009). Assim o termo levantamento de peso refere-se a um esporte competitivo que envolve rendimento, levantamentos e arremessos de peso (FAIGENBAUM et al., 2009).

Exercício anaeróbico (treinamento) é realizado com intensidade muito alta, em que uma grande quantidade de energia é fornecida pela glicólise e armazenada em fosfocreatina (HOWLEY, 2001). São exemplos de destas atividades o treinamento intervalado, conduzido por uma produção de força bem além da capacidade aeróbica máxima do indivíduo, assim como o treinamento resistido (HOWLEY, 2001).

Na revisão de Alway et al. (2005) que pesquisou sobre treinamento resistido (TR) e sua aplicação no envelhecimento, explicou-se que devido às diferentes variáveis (e.g.: estimulação por alimento, por choque elétrico, alongamento e anestesia) não é possível se determinar a carga máxima que pode ser exercida de forma voluntária

pelos diferentes tipos de animais (e.g.: ratos, gatos, pôneis e cavalos). Além disso, Nicastro et al. (2011) afirma que o impacto de diferentes protocolos de TR (volume, intensidade, frequência e intervalo de recuperação) nas condições de atrofia são desconhecidos. (NICASTRO et al., 2011) o controle e a manipulação de variáveis são cruciais na repostas musculares. Estes autores concluem que, em estudos futuros as avaliações do TR em várias condições de atrofia poderiam determinar os efeitos de manipulação das variáveis de TR no que diz respeito a otimização funcional e morfológica das respostas. Eles ainda sugeriram que tais manipulações poderiam promover marcas distintas (impressões digitais) na musculatura esquelética o que otimizaria os efeitos terapêuticos do exercício resistido.

É consenso que muitas adaptações possíveis ao exercício aeróbico podem ocorrer em menor proporção para os anaeróbicos, pois independente de quaisquer vias de uso do ATP durante o exercício, para as vias energéticas, é o pós-exercício o responsável por reestabelecer a célula utilizando a via aeróbica. Desta forma, abaixo são elencadas algumas adaptações frente à estimulação por treinamento resistido:

- a) estimula as células satélites a se diferenciarem, replicarem e se fundirem com os miócitos aumentando o número de núcleos da célula muscular (KADI et al., 2005);
- b) aumento nas reservas de cálcio intracelular principalmente nas fibras rápidas (Tipo 2 "A" e "X") (CHIN et al., 1998);
- c) aumento de proteínas dentro de cada célula (CHESLEY et al., 1992);
- d) aumento da expressão da cadeia pesada de miosina (SANT'ANA PEREIRA et al., 1996);
- e) aumento da concentração de Creatina fosfato e sua enzima (creatina quinase) (NEWHAM; JONES; EDWARDS, 1983);
- f) hipertrofia muscular e aumento acentuado de força (GLASS, 2005);
- g) aumento da expressão da IGF-1 via IP-3K/PBK (DEVOL et al., 1990);
- h) a síntese proteica é exacerbada via PKB(Akt)/mTOR (GLASS, 2005; JEWELL; RUSSELL; GUAN, 2013), dentre as proteínas que têm expressão positiva estão as ligadas ao metabolismo da glicólise, purinas

e pirimidinas dentre e transportadores de glicose (JEWELL et al., 2013; LUO et al., 2013);

- i) aumento da lactato desidrogenase (LDH5 ou MMMM) no músculo (FERNANDEZ-GONZALO et al., 2014);
- j) pode haver um aumento de NAD (dado não comprovado).

É importante ressaltar que estas adaptações são dependentes da intensidade, do tempo de cada série do exercício e do intervalo entre uma série e outra.

1.3.1.2 Exercício físico aeróbico

Atividade aeróbica, também chamada de atividade de resistência, melhora a capacidade cardiorrespiratória (CASPERSEN et al., 1985). E a (WHO, 2010) apresenta como exemplos desta atividade aeróbica, considerando a média da população, a caminhada rápida, a corrida, o ciclismo, o pular corda, a natação, dentre outros.

Exercício aeróbico (treinamento) envolve grupos musculares grandes em atividade dinâmica que resulta em um aumento substancial da frequência cardíaca e gasto de energia (HOWLEY, 2001). A participação regular resulta na melhora em funções do sistema cardiovascular e músculo esquelético, levando ao aumento do rendimento de resistência (HOWLEY, 2001). Desta forma, pode-se notar algumas adaptações frente à estimulação por treinamento aeróbico:

1. Aumento da atividade de enzimas chaves na oxidação (SCHANTZ; HENRIKSSON; JANSSON, 1983).
2. Aumento da sensibilidade de adipócitos a epinefrina, estimulando a lipólise (CRAMPES et al., 1986).
3. Aumento da sensibilidade intramuscular a epinefrina (PHILLIPS et al., 1996) estimulando a oxidação de ácidos graxos (HOLLOSZY; BOOTH, 1976; SALTIN; ROWELL, 1980).
4. Aumento da capacidade antioxidante das células musculares como, por exemplo, a superóxido dismutase (LEEUEWENBURGH et al., 1994).
5. Aumento das reservas de glicogênio (SCHANTZ et al., 1983).

6. Aumento de mioglobinas, que servem para o transporte e armazenamento de oxigênio, além de funcionar possivelmente como antioxidante (GARRY; KANATOUS; MAMMEN, 2003).
7. Aumento do conteúdo mitocondrial por grama de tecido e/ou uma mudança na composição mitocondrial como, aumento da atividade das enzimas da cadeia respiratória e da a concentração de citocromo c, aumentando assim, proteínas intramitocondriais (HOLLOSZY, 1967).
8. Aumento de eritrócitos e da concentração de hemoglobina (RODGERS; FISHER; GEORGE, 1975; SCHOOLEY; MAHLMANN, 1975).
9. Aumento de mioglobina intracelular (LAWRIE, 1953).
10. Aumento da mitocôndriogênese (GOMEZ-CABRERA et al., 2008).
11. Aumento na densidade de capilares (HERMANSEN; WACHTLOVA, 1971).
12. Aumento da captação e consumo de oxigênio (WASSERMAN; MCILROY, 1964).
13. Aumento do débito cardíaco por aumento no volume de ejeção do ventrículo esquerdo (ASTRAND et al., 1964).
14. Aumento da expressão gênica de GLUT4 (KRANIOU et al., 2000).
15. Altos níveis de PGC-1alfa são encontrados em fibras oxidativas comparadas com fibras glicolíticas, mesmo em um estado de descanso (LIN et al., 2002).
16. Aumento da ativação da AMPK (HUTBER; HARDIE; WINDER, 1997) e da expressão em modelos animais (DURANTE et al., 2002) e em humanos (NIELSEN et al., 2003).
17. Aumento da atividade (FERRARA et al., 2008) e expressão da SIRT1 (SUWA et al., 2008).
18. Aumento da utilização de gordura e diminuição da oxidação de glicose, reservando esta para atividade mais intensas e/ou para tecidos que não utilizam gordura como fonte de energia (PHILLIPS et al., 1996).

1.4 Músculo esquelético

Para Rozzoli et. al., (2013) que aborda o tema de qualidade de vida e sarcopenia a "força" é primordial para que todos os seres humanos adultos tenham boa qualidade de vida, especialmente no caso dos idosos. E considerado isso existem três grandes dimensões envolvendo qualidade de vida relacionados à saúde: (a) função ocupacional/física, (b) saúde social/integração e (c) estado de saúde mental/psicológica, além de outros três não relacionados a saúde que incluem: (d) aspectos econômicos financeiros (e) aspectos espirituais e políticos e (f) fatores ambientais (SPILKER, 1996).

O músculo esquelético é o mais abundante tecido no corpo dos vertebrados, constituindo nos humanos por volta 40-45% da massa total (GARRETT; BEST, 1994). Este é composto de faixas de miofibras contráteis, alongadas nas células sinciciais, cada uma contendo vários mionúcleos com um citoplasma contínuo (GARRETT; BEST, 1994). A função primária do músculo é gerar força em resposta ao estímulo nervoso, desta forma movendo o esqueleto de maneira controlada, além de desenvolver importante papel na termorregulação e também como armazenador de energia e proteína (GARRETT; BEST, 1994).

Garrett e Best (1994) subdividem em três tipos as miofibras no ser humano:

- a) tipo 1 (oxidativas, lentas, vermelhas, mais resistentes a fadiga);
- b) tipo 2 (glicolíticas, rápidas, brancas, menos resistentes a fadiga), subdivididas em duas:
 - 2A (intermediárias entre 1 e 2X);
 - 2X (a mais rápida de todas).

As fibras musculares podem ser classificadas em grupos baseados em suas propriedades tais como: (a) velocidade de contração, (b) expressão cadeia pesada de miosina (MyHC) e (c) capacidade metabólica (SPANGENBURG; BOOTH, 2003; ZIERATH; HAWLEY, 2004).

De forma geral, o músculo adulto de mamíferos pode conter quatro formas principais do gene MyHC, uma isoforma lenta (MyHCI) e três isoformas rápidas

(MyHCIIa, MyHCIIx e MyHCIIb) (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994; SMERDU et al., 1994; SPANGENBURG; BOOTH, 2003). Notavelmente, o músculo esquelético humano não expressa o gene MyHCIIb que expressa o tipo de fibra IIB, no entanto são expressos os genes MyHCI, MyHCIIa, MyHCIIx que são traduzidos em tipos de fibras I, IIA e IIX (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994; SMERDU et al., 1994; SPANGENBURG; BOOTH, 2003).

1.5 Sistema imunológico e exercício físico

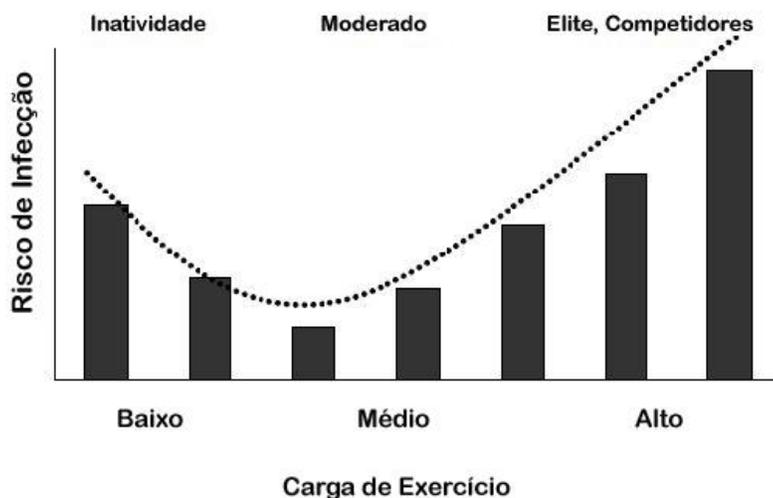
A atividade física afeta o sistema imunológico de diferentes formas e estas são dependentes da intensidade e duração do exercício (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b). Estudos comprovaram que a atividade física regular induz ao aumento, em nível sistêmico, do número de citocinas com propriedade Th2 (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). E esta modulação do sistema imunológico tem sido amplamente discutida para as diferentes intensidades de exercícios, tipos de exercício e aplicações destes exercícios como agentes curativos ou preventivos de doenças como obesidade e câncer, dentre outras (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b) ficando evidente a necessidade do estudo da imunologia (SHEPHARD, 2010; BORTOLINI et al., 2013). Recentemente foi sugerido que o sistema imunológico de animais exercitados seja modulado de forma benéfica a ponto de desencadear, quando no combate de um parasito intracelular, uma resposta imune efetora específica (TERRA et al., 2013).

Fatores importantes relacionam exercício físico (tanto em intensidade quanto em volume de treinamento) e sistema imune à diminuição do risco de enfermidades (ALMEIDA et al., 2009; ROMEO et al., 2010; NETO et al., 2011; WILLIAMS, 2013). Diversos estudos preconizam exercícios físicos moderados como benéficos à saúde enquanto os exaustivos determinam o caminho oposto (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b). Almeida et al. (2009) pesquisaram, em modelo murino (camundongos Swiss machos), se haveria diferença entre intensidades (50 e 80% da carga máxima) de exercício (natação, 1h/dia, 6 semanas) em relação ao crescimento de células tumorais de Ehrlich quando comparados com camundongos sedentários. Encontraram que não houve diferença estatística entre volume e peso do tumor para os grupos sedentário e

exercitado exaustivamente (80%), no entanto o grupo que treinou moderadamente (50% da carga máxima) teve para ambos os fatores, valores mais de 270% menores quando comparados aos outros dois grupos (sedentários e treinados à 80%).

O modelo de curva em "J" foi proposto (NIEMAN, 1994) para representar que o excesso de exercício físico é prejudicial ao organismo, sugerindo assim uma "open window" para infecções do trato respiratório superior, conforme figura 9 abaixo.

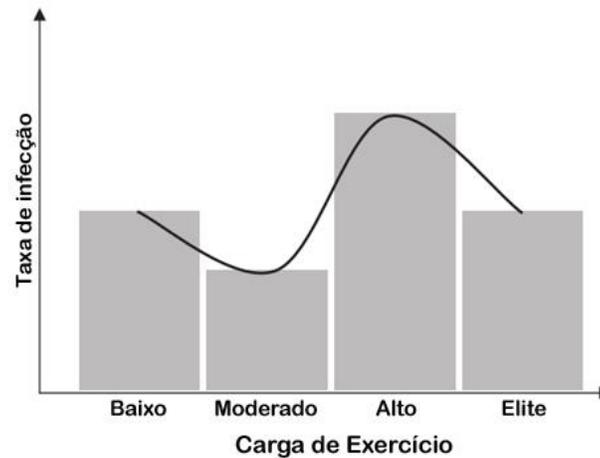
Figura 9 - O risco de Infecção em relação a atividade física



Fonte: Nieman (1994)

Nesta mesma perspectiva, (MALM, 2006) sugeriu posteriormente uma curva em "S", relacionando a intensidade do exercício ao risco de infecção do trato respiratório superior, conforme figura abaixo.

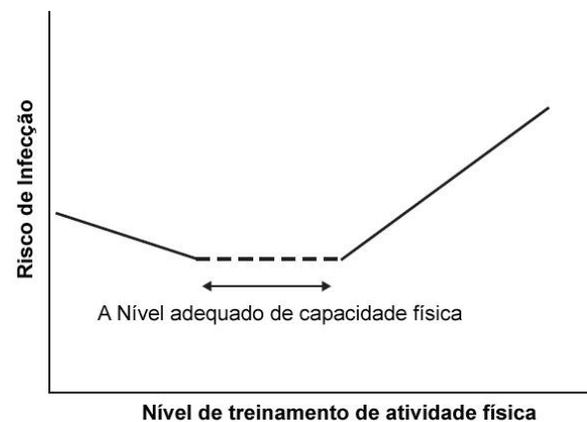
Figura 10 - Proposta de relação da curva em S entre a carga de treinamento e taxa de infecção



Fonte: Malm (2006)

Recentemente a curva em "J" proposta por Malm (2006) ganhou mais adeptos, não apenas ao abordar os processos infecciosos do trato respiratório superior, mas também por contemplar vários outros tipos de infecções conforme figura abaixo (ROMEO et al., 2010).

Figura 11 - Modelo proposto entre nível de treinamento de atividade física e risco de infecção



Modelo proposto da associação entre nível de treinamento de atividade física e risco de infecção.

Fonte: Romeo et al. (2010)

O estudo de Shimizu et al. (2008) corrobora com o estudo de Romeo et al. (2010) por ter encontrado que o exercício físico moderado realizado com humanos idosos está associado com melhora da expressão de CD28 em células T auxiliares e com o balanço de citocinas Th1/Th2, especialmente quanto ao aumento de IFN γ e de resposta a estimulação de linfócitos T CD4⁺.

A IL-6 tem-se destacado nos estudos recentes devido à procura de biomarcadores de estresse imunológico (GLEESON, 2000; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Através da manipulação do conteúdo de glicogênio muscular tanto a expressão de mRNA de IL-6 intramuscular (KELLER et al., 2001) quanto a produção proteica e liberação (STEENSBERG et al., 2001) foram acentuadas quando houve menor taxa de glicogênio intramuscular, sugerindo portanto que a IL-6 funcionou como um sensor de energia (GLEESON, 2000). Além disso, inúmeros estudos mostraram que a ingestão de glicose durante o exercício físico atenuou o aumento plasmático de IL-6 (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008) e totalmente inibiu a liberação de IL-6 da contração muscular esquelética em humanos (FEBBRAIO et al., 2003). Um outro biomarcador que se destaca na análise de risco de infecção do trato respiratório superior é o pH do condensado do ar exalado (RIEDIKER; DANUSER, 2007; GREENWALD; FERDINANDS; TEAGUE, 2009).

Portanto o exercício físico pode influenciar em vários parâmetros do sistema imune (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b), como se pode verificar no quadro abaixo elaborado por Romeo (2010) que apresenta os fatores a serem afetados pelo exercício físico na resposta imune inata e adaptativa.

Quadro 3 - Principais efeitos do exercício agudo versus moderado tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa

	Imunidade Inata	Imunidade adaptativa (imunidade celular)
Exercício agudo (90 min ou mais)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ no número de células NK circulantes⁽¹¹⁾ ↓ da atividade citolítica e da contagem das células NK após o exercício⁽²⁸⁾ ↑ no número de neutrófilos e monócitos circulantes⁽⁵²⁾ ↑ da fagocitose de monócitos e neutrófilos⁽³⁵⁾ ↓ da capacidade fagocítica de neutrófilos nasais (supressão transitória)⁽²⁷⁾ ↓ da expressão de receptores similares ao Toll⁽³⁵⁾ ↑ da produção de cortisol ↑ níveis de CRP⁽³⁶⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ No número de linfócitos circulantes⁽³⁵⁾ ↓ da resposta proliferativa de linfócitos à mitógenos⁽¹⁹⁾ ↓ no número de linfócitos e linfócitos T circulantes ↑ da taxa de CD4+/CD8+ após exercício estenuoso ou prolongado ↑ do nível de citocina pró-inflamatória IL-6^(35,38) ↑ do nível de citocinas anti-inflamatórias e IL-10 e IL-1ra ↓ dos níveis de TNF-α Indução da lipólise ↓ da taxa de Th1/Th2⁽¹⁵⁰⁾ ↓ de níveis nasais e salivares de IgA⁽²⁷⁾ ↓ da expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II de macrófagos^(27,35,151) ↑ da contagem de células T de memória (CD45RO+) e T naive (CD45RA+)^(154,156) ↑ da taxa de CD45RO+/CD45RA+^(154,156) - Alteração do mecanismo regulatório⁽¹⁵⁰⁾ - Supressão da imunidade celular → "janela imunológica" ↓ resposta de mRNA de IL-6 induzida pelo exercício após 10 semanas de treinamento (homens jovens não treinados)⁽¹⁵⁷⁾ ↓ Concentrações sistêmicas de IL-6 em pessoas idosas com risco para incapacidade⁽¹⁵⁸⁾ Não suprime a resposta salivar de IgA ou altera a secreção de cortisol⁽¹⁵⁹⁾
Exercício moderado (efeitos anti-inflamatórios)	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Níveis de biomarcadores que são utilizados para avaliar a inflamação sistêmica (produção de citocinas inflamatórias estimuladas por mitógeno, conteúdo proteico inflamatório de músculo esquelético, produção de adipocinas, níveis sorológicos de CRP)⁽³⁵⁾ 	

CRP, proteína C reativa; NK, células assassinas naturais; Th, T auxiliar; ↑, aumento; ↓, diminuição.

Fonte: Romeo (2010)

1.5.1 Músculo esquelético e sistema imunológico

O músculo é tido como um órgão endócrino, uma vez que pode, frente à estímulos (e.g.: exercícios resistidos e aeróbico) liberar citocinas, definidas também como miocinas (PEDERSEN et al., 2007; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Dentre as citocinas produzidas durante o exercício resistido estão IL-7 (HAUGEN et al., 2010), IL-8 (AKERSTROM et al., 2005), IL-4 e seu receptor alfa (PROKOPCHUK et al., 2007), IL-13 e seu receptor alfa 1 (PROKOPCHUK et al., 2007) e em maior quantidade IL-15 (NIELSEN et al., 2007). Frente à contração muscular, o músculo pode produzir IL-6 (STEENSBERG et al., 2000), especialmente durante exercícios aeróbicos e de longa duração (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Em estudos com humanos que realizaram exercícios aeróbicos foi encontrado que a IL-8 aumentou consideravelmente no sangue (NIEMAN et al., 2001; OSTROWSKI et al., 2001).

A IL-15 foi identificada como um fator anabólico de crescimento muscular perante o exercício resistido em humanos e parece desenvolver importante papel no metabolismo de lipídeos (NIELSEN et al., 2007) além de também estar envolvida na diminuição de até 33% da massa de tecido adiposo branco (CARBO et al., 2001).

A inflamação induzida pelo exercício inicia-se com IL-6, seguida por citocinas inibidoras como IL-1ra, IL-10, e receptores solúveis de TNF- α (sTNF-R), não havendo a clássica produção de TNF- α e nem de IL-1 β (OSTROWSKI et al., 1998; OSTROWSKI; SCHJERLING; PEDERSEN, 2000).

Macrófagos têm várias funções clássicas que incluem atividade microbiana, fagocitose e apresentação de antígeno, além disso, estas células de multifacetadas eficientemente auxiliam o crescimento e diferenciação de outros tipos de células (GORDON, 1995; LASKIN; LASKIN, 2001) incluindo as satélites (CHAZAUD et al., 2003) desenvolvendo assim, um papel fundamental no reparo tecidual e manutenção da homeostasia (GORDON, 1995).

As células miogênicas são quimiotáticas para monócitos, agindo através de cinco sistemas moleculares quimiotáticos identificados: (a) quimiocina derivada de macrófago (MDC), (b) proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP-1), (c) fractalcina

(CX3CL1), (d) fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e (e) o sistema da uroquinase (uPA) (CHAZAUD et al., 2003).

Os resultados de Arnold et al. (2007) mostraram que após injúria a regeneração muscular se caracteriza por uma população sequencial de macrófagos:

- a) no tecido estão os macrófago inflamatórios (M1), os quais estão associados com recrutamento de monócitos e remoção do material necrótico;
- b) em seguida os macrófagos anti-inflamatórios (M2) aparecem e são associados com a cura e reparo do tecido.

A via de sinalização por NF κ B não é ativada por contração em músculo esquelético humano (CHAN et al., 2004; STEENBERG et al., 2007), sugerindo que a transcrição do gene da IL-6 do músculo esquelético humano seja provavelmente não dependente da ativação da via de sinalização por IKK/NF κ B (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008).

Em trabalho recente foi demonstrado que com a indução por IL-6, a sinalização de STAT3 ocorreu exclusivamente no núcleo de células satélites (CS) em resposta a contração e estiramento muscular e o aumento no número de CSs cMyc⁺ indica que CSs humanas foram induzidas para proliferar sob o controle da sinalização de STAT3 (TOTH et al., 2011).

Experimento realizado *in vitro* demonstrou-se que o aumento de Ca²⁺ resultou em um aumento tempo-dose dependente em mRNA de IL-6 concomitantemente com uma diminuição da expressão de TNF- α , demonstrando assim, uma resposta diferenciada entre estas citocinas (KELLER et al., 2006). Sendo que quando provocaram o bloqueio do calcinério o resultado foi a inibição da resposta de IL-6 para ionomicina, indicando assim que esta via desenvolve o principal papel na produção de IL-6 induzida pelo Ca²⁺.

A IL-6 aumenta tanto a captação de glicose basal, que parece estar envolvida com a AMP-quinase, quanto a translocação de transportador de glicose do tipo 4

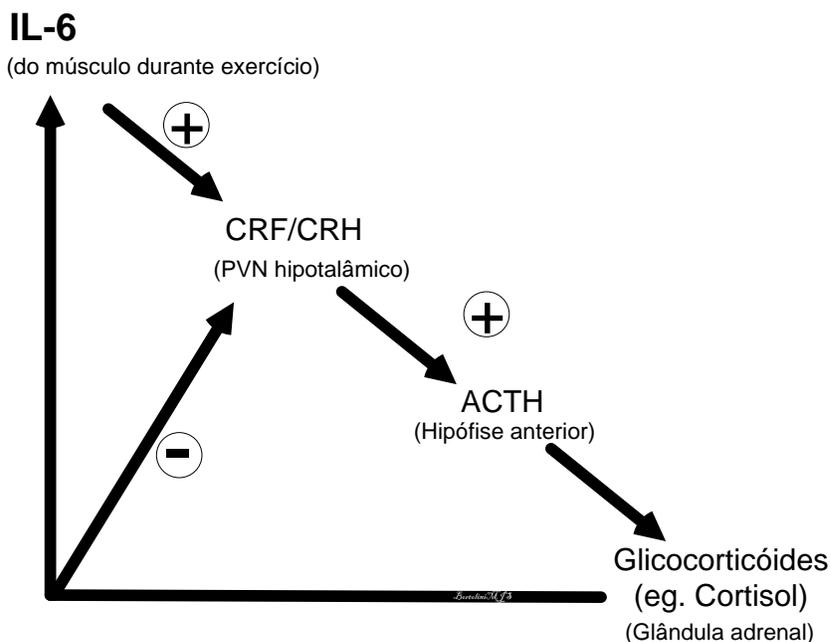
(GLUT4) de compartimentos intracelulares para a membrana plasmática (CAREY et al., 2006).

Foi sugerido que a fosforilação de p38 MAPK pode ser um evento importante que leva a uma ativação diminuída de coativadores nucleares e seus ligantes para a área de regulação de transcrição do gene de IL-6 na contração muscular (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008).

O aumento da formação do complexo IL-6/IL-6R que interage com gp130 na membrana de células T na falta de IL-6R membrânico, através da trans-sinalização, leva ao aumento da expressão e translocação nuclear de STAT3 e causa, assim, a indução de genes anti-apoptóticos, tais como, Bcl-xl e Bcl-2, resultando no aumento da resistência de células T à apoptose (ATREYA et al., 2000; JOSTOCK et al., 2001).

Sobre a produção de cortisol após exercícios físico propõe-se um modelo (Figura 12) pelo qual a IL-6, produzida pelo exercício, seja um fator anti-inflamatório tardio, via estimulação da produção tardia de cortisol.

Figura 12 - Esquema proposto para o efeito anti-inflamatório tardio, via HPA dependente de IL-6 muscular, pós-exercício



Durante o exercício físico produz-se IL-6 (STEENBERG et al., 2000) e está inversamente relacionada

aos níveis de glicose musculares (FEBBRAIO et al., 2003; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Tanto sua transcrição (KELLER et al., 2001) quanto sua secreção (STEENSBERG et al., 2001) ficam então aumentados no músculo esquelético. Em inúmeros trabalhos IL-6 tem seus níveis plasmáticos aumentados (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008) e estes estimulam o eixo HPA (VENIHAKI et al., 2001). A IL-6, *IL-1 β (NAVARRA et al., 1991; KAGEYAMA et al., 2010) e *TNF- α (KAGEYAMA et al., 2010) estimula a liberação de CRF pelo PVN, o qual, via receptor 1 de CRF, estimula a produção de ACTH que estimula a liberação de glicocorticóides na glândula adrenal e por sua vez estes inibem tanto a produção de CRF no PVN hipotalâmico quanto o ACTH na glândula pituitária (WHITNALL, 1993). Com este aumento de glicocorticóides a produção de IL-6 também é inibida (KARALIS et al., 1997; TURNBULL; RIVIER, 1999). TNF- α , Fator de necrose tumoral; IL-6, interleucina do tipo 6; IL-1 β , interleucina do tipo 1 beta; PVN, núcleo paraventricular hipotalâmico; CRF/CRH, Fator (hormônio) de liberação de corticotropina; eixo HPA, hipotálamo-pituitária-adrenal; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; *Citocinas suprimidas neste esquema.

Fonte: Próprio autor, 2014.

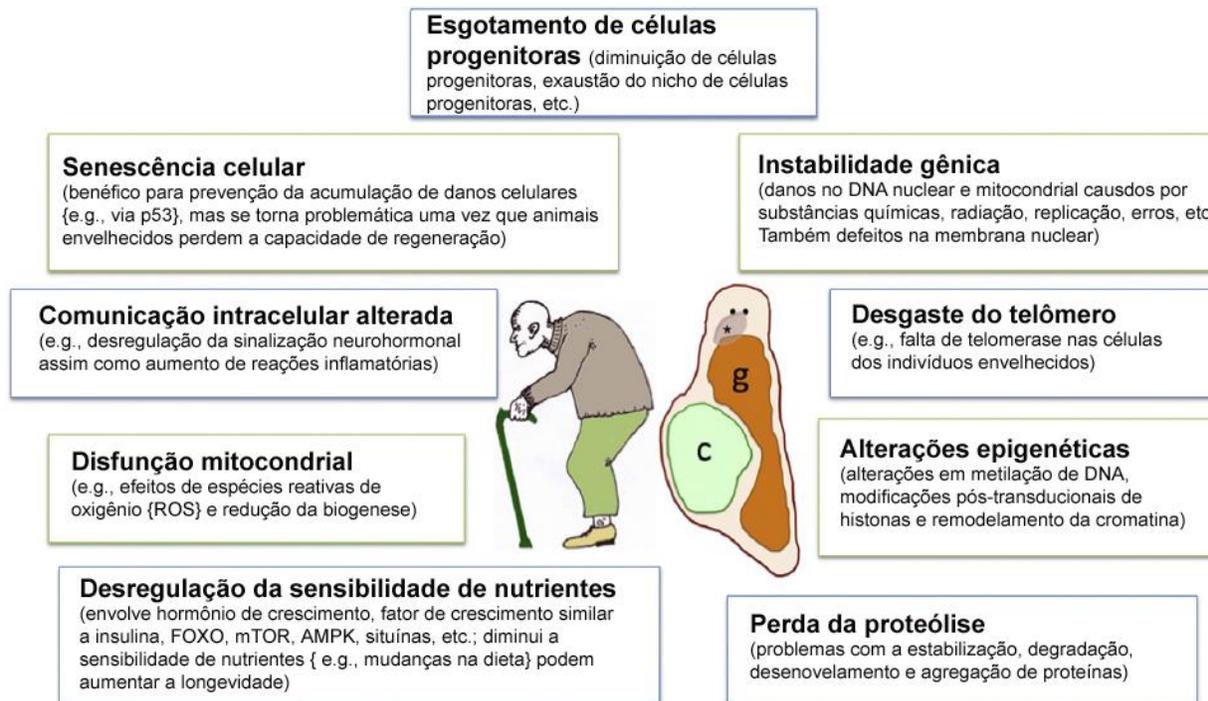
Treinamento físico prolongado diminui a sensibilidade de glicocorticoides e níveis de mRNA de seus receptores combinados com um decréscimo de mRNA de genes relacionados à via do NF κ B (SOUSA E SILVA et al., 2010).

1.6 Envelhecimento e sistema imune: atividade física

O envelhecimento é “todo o fenômeno de deterioração de tecidos, câncer, e propensão à infecção pode ser interpretado como sinais de envelhecimento ao nível somático das células progenitoras” (HO; WAGNER; MAHLKNECHT, 2005).

O trabalho de Petralia; Mattson; Yao (2014), referenciando-se por estudos previos (MOUTON et al., 2009; LOPEZ-OTIN et al., 2013) ilustrou na figura 13 os principais acontecimentos que levam ao envelhecimento.

Figura 13 - Mecanismos de envelhecimento



O diagrama ilustra nove destaques do envelhecimento como descrito por López-Otin et al. (2013); O envelhecimento de animais frequentemente mostra mudanças notáveis na aparência, forma do corpo e postura. O centro uma silueta estereotipada de uma pessoa envelhecida careca, e postura curva devido a vários efeitos de doenças degenerativas. Alguns platelmintos envelhecidos, podem mostrar mudanças compatíveis tais como sulcos evidentes na cabeça (asterisco) e corpo deformado por cistos (c) Note como o trato digestório ou intestino (g) é deslocado para lateral. Os dois pontos pretos representam os olhos. O desenho é original baseado em micrografias de *Macrostomum lignano* [(Mouton et al., (2009)].
Fonte: Petralia; Mattson; Yao, (2014).

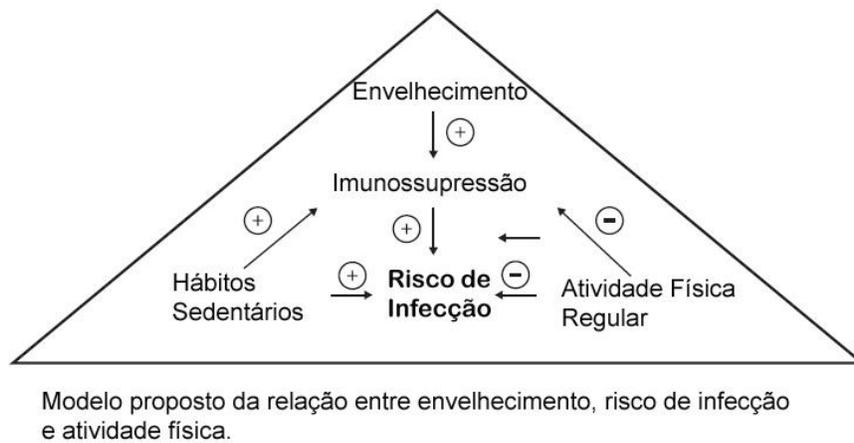
No que se refere ao músculo esquelético seu envelhecimento é caracterizado por um decréscimo no número de células satélites por fibra (SNOW, 1990; KADI et al., 2004). Além disso, ficou constatado que os níveis de mRNA para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também diminuem dificultando à angiogênese (CROLEY et al., 2005).

A imunossenescência é bem caracterizada pela deterioração do sistema imune associado com o envelhecimento cronológico (PAWELEC, 1999). Este está associado com involução tímica, diminuição no número de células T naive, e aumento no número

de linfócitos T de memória e efetores associado à diminuição do repertório das mesmas (HAKIM; GRESS, 2007). Além disso, há um aumento das células T pró-inflamatórias com menor dependência de co-estimulação para ativação (HAKIM; GRESS, 2007). O sistema imune inato também é alterado, como as mudanças bem documentadas nas células assassinas naturais (NK) que tem um aumento no número, mas com diminuição de suas funções (MOCCHIGIANI; MALAVOLTA, 2004).

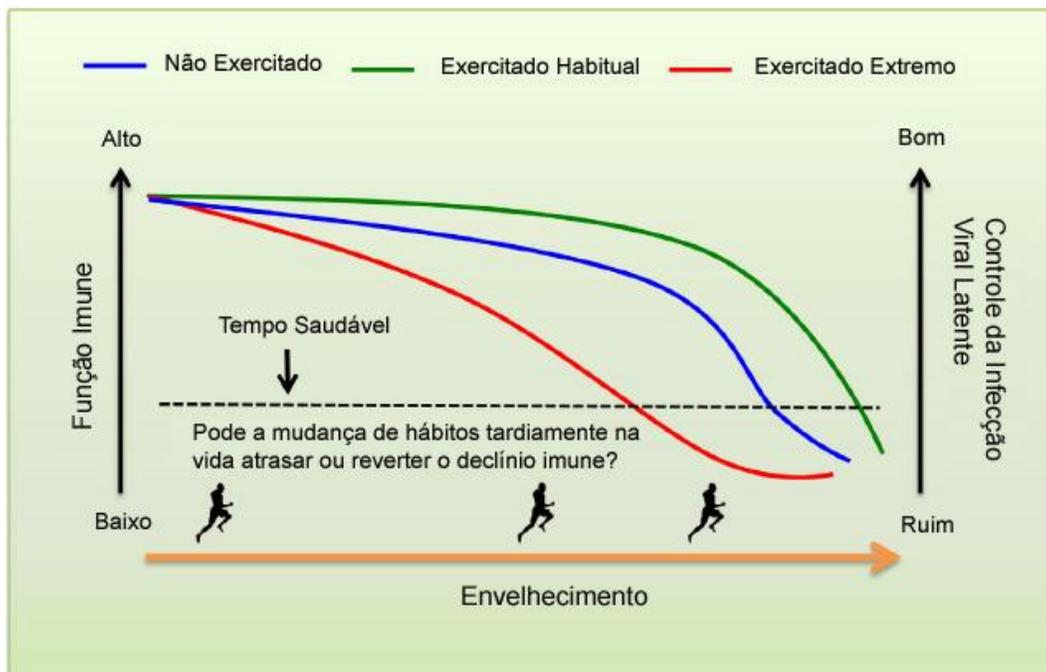
O envelhecimento leva tanto a uma diminuição da quantidade total de células T (UTSUYAMA et al., 1992) quanto na diminuição da expressão de CD28 (VALLEJO, 2005). Em recente trabalho foi encontrado que níveis de proteínas de membrana CD40, CD45 e CTLA-4 (ligante inibidor de CD28) estão elevados em adultos idosos saudáveis (YALCIN et al., 2012). No entanto, esta perda de CD28 pode ser diminuída com a prática de exercícios físicos regulares moderados (SHIMIZU et al., 2008). Em concordância com este achado, a prática do exercício físico regular aponta para um aumento da longevidade (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008; YATES et al., 2008), especialmente ligado à diminuição do risco de infecção conforme ilustrado nas fFigura 14 e Figura 15 (ROMEO et al., 2010; SIMPSON; BOSCH, 2014) assim como a diminuição da incidência de doenças ligadas ao sedentarismo e à obesidade (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008; WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b). Em estudo recente, (BACHI et al., 2013), demonstrou que o exercício físico regular em idosos mostrou ser um adjuvante na vacinação ao potencializar a produção de anticorpos IgM e IgG específicos em resposta ao vírus influenza.

Figura 14 - Modelo proposto da relação entre envelhecimento, risco de infecção e atividade física



Fonte: Romeo et al. (2010)

Figura 15 - Relação proposta entre hábito de exercício e função imunológica ao longo da vida



Aqueles os quais participam de atividade física regular, motivados para uma proposta de saúde e bem estar (Exercitado Habitual) experimentam um tempo de vida mais longo e até mais saudáveis (o tempo de vida gasto em uma boa saúde) do que aqueles os quais vivem com um estilo de vida sedentário (Não

Exercitados). Controversamente, aqueles que participam em exercícios extremos (i.e. consistente com a prática de atletas de alto rendimento) experimentam crises na imunidade que podem impactar negativamente de forma geral no tempo de vida e vida saudável, particularmente se altos volumes de treinamento são mantidos por três ou quatro décadas da vida. Um aumento corporal de evidências tem implicado a infecção latente com citomegalovirus (CMV) na imunossenescência especialmente com o ramo adaptativo do sistema imune. A interação entre exercício e controle viral (em particular CMV) vai provavelmente servir como o principal determinante da função imune, na vida saudável e longevidade através da vida. Dado esta ligação putativa entre infecção por CMV e mudanças relacionadas à idade que caracterizam a imunossenescência, intervenções de treinamento de exercícios futuras poderão ser objetivadas na melhora do controle imunológico da latência viral assim como o oposto para alteração da imunidade diretamente. Este modelo também aumenta a questão como se ou não mudanças nos hábitos de exercícios tardios na vida podem alterar a trajetória do declínio imune relacionado à idade, evidenciando a necessidade para um novo teste clínico longitudinal humano nesta área.

Fonte: Simpson; Bosch (2014).

Como mencionado anteriormente (item 1.1.4), à utilização de animais experimentais como C57BL/6 é essencial, e principalmente quando o objetivo for avaliar funções imunofisiológicas em modelo senil, é importante elencar parâmetros de comparação. Harrison (2011) apresenta na figura abaixo a comparação entre as idades de camundongos C57BL/6 e seres humanos

Figura 16 - Fases equivalentes da vida dos camundongos C57BL/6 comparados com os humanos

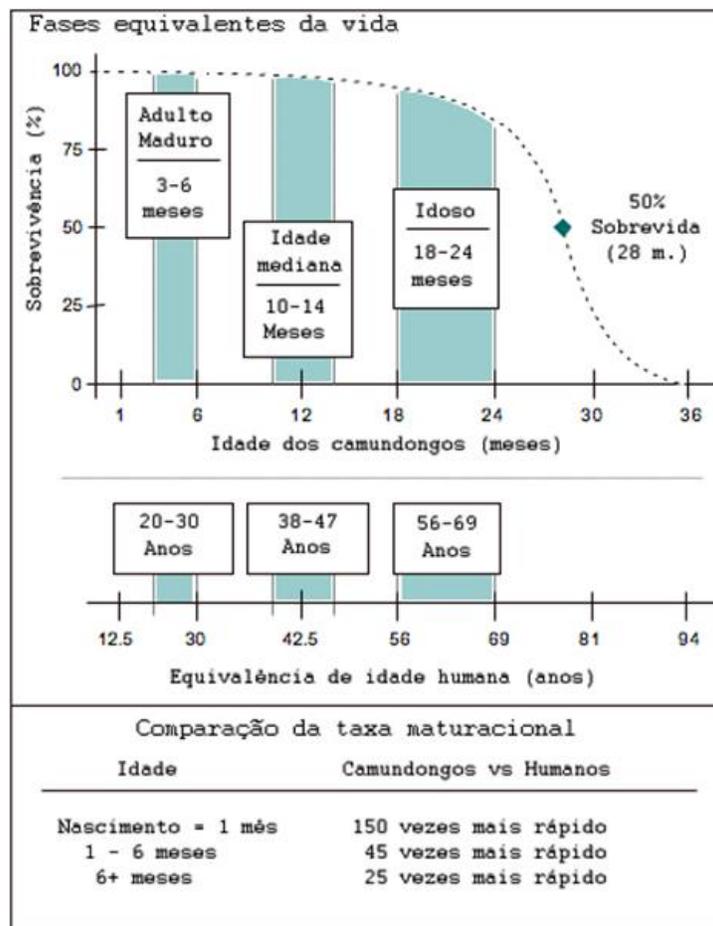


Figura representativa da média da idade para os estágios de história de vida madura nos camundongos C57BL/6J em comparação com os seres humanos. [Adaptada da Fig. 20-3: Flurkey; Curren; Harrison. (2007). The Mouse in Aging Research. In The Mouse in Biomedical Research 2nd Edition. Fox JG, et al, editors. American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier), Burlington, MA. pp. 637–672.).]

Fonte: Harrison (2011)

Portanto, levando-se em consideração os benefícios que prática de exercícios físicos regulares pode promover ao organismo (especialmente ao sistema imunológico), a relação da efetividade deste sistema com o envelhecimento e a ubiquidade mundial que o *T. gondii* possui, pode-se afirmar que a realização de pesquisas focadas na relação do exercício físico e na modulação do sistema imune,

utilizando-se modelos animais em diferentes fases da vida e parasitados pelo protozoário mais comum do mundo, o *T. gondii*, são necessárias na atualidade.

2 OBJETIVOS

O presente estudo objetivou avaliar se camundongos machos C57BL/6 exercitados versus sedentários, ambos infectados por *T. gondii*, apresentavam diferenças em determinados componentes da resposta imunológica.

2.1 Objetivos específicos

Desenvolver e validar aparato para treinamento de exercícios físicos resistidos.

Verificar a susceptibilidade de camundongos previamente treinados versus sedentários, ambos infectados após início do treinamento e eutanasiados no 30º dia de infecção.

Verificar a sobrevivência de camundongos treinados versus sedentários, ambos infectados (com seis semanas de idade) e com início dos exercícios no 30º dia após a infecção.

Analisar parâmetros imunológicos, tais como IL-10 e IFN- γ em esplenócitos de camundongos previamente treinados versus sedentários, ambos infectados após início do treinamento e eutanasiados no 30º dia de infecção.

Analisar o parasitismo cerebral dos camundongos treinados versus camundongos sedentários, tanto por imunohistoquímica quanto por qPCR, ambos infectados após início do treinamento e eutanasiados no 30º dia de infecção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos BALB/c e C57BL/6 machos de diferentes idades (de quatro a 18 semanas de idade). Cada grupo foi estabelecido inicialmente com seis camundongos e foram mantidos em gaiolas apropriadas em sala separada em ciclo claro-escuro, com fotoperíodo artificial de 12 h/12 h, sendo as luzes ligadas as 07:00 h e desligadas as 19:00 h. Todos os experimentos foram iniciados após uma semana de adaptação ambiental e física dos animais com água e alimentação *ad libitum*. Os experimentos e procedimentos foram realizados após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFU), sob Protocolo Nº 053/10.

Na maioria dos experimentos os camundongos (C57BL/6 ou BALB/c) foram infectados com *T. gondii* (de oito a 12,5 semanas de idade) após o início dos exercícios. E em outro experimento (curva de sobrevivência) os camundongos (C57BL/6, seis semanas de idade) foram infectados antes do início dos exercícios (30 dias após a infecção, fase crônica). Todos os camundongos (C57BL/6 ou BALB/c) foram eutanasiados por deslocamento cervical.

3.2 Infecção oral

Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 foram obtidos de cérebro de *C. callosus* de 30-45 dias após a infecção descrita previamente (BARBOSA et al., 2007). Sucintamente, os cérebros foram removidos, lavados em tampão estéril de fosfato e salina (PBS, pH 7,2), em seguida foram triturados, homogeneizados e centrifugados à 1000 g por 10 min. Os cistos foram então contados por microscopia óptica (40x de aumento). A suspensão teve a quantidade de cistos ajustados para 100 µl. Para a infecção (por gavagem) foi adotado o seguinte procedimento: logo após a realização da infecção oral de cinco a 10 cistos para os camundongos C57BL/6 e de 20 a 100 para os BALB/c foi ofertado aos animais mais 100 µl de água filtrada, utilizando-se as mesmas seringa e agulha utilizadas para o procedimento de infecção. Para prevenir a

regurgitação da suspensão com cistos os animais tiveram restrição de água por quatro horas.

3.3 Experimento de soroconversão

Para confirmar a soroconversão dos camundongos em todos os experimentos, a coleta de sangue foi realizada por via do plexo orbital, com capilar, no 30º dia após a infecção por *T. gondii*. Em seguida, utilizando-se capilares sem anti-coagulante para coleta de sangue do plexo orbital, obteve-se os soros que foram utilizados para a realização imunoensaios por ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* do isotipo IgG, como previamente descrito (BARBOSA et al., 2007).

Para alguns experimentos foram analisados o isotipo IgM (ELISA indireto) e outras subclasses de IgG (IgG₁ e IgG_{2a}) por protocolos de ELISA indireto (KANG et al., 2006). Em todos os animais não infectados os mesmos procedimentos foram realizados e suas amostras foram utilizadas como controles negativos do experimento. O *Cutoff* para o índice ELISA foi considerado ser 1,2, como descrito previamente por Mineo; Camargo; Ferreira, (1980).

3.4 Perfil de citocinas

Amostras de sangue foram coletadas antes da infecção, quando então foram processadas, nas respectivas amostras de soro, a quantificação de IL-10 e IFN γ , pelo método de ELISA de duplo anticorpo (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Utilizou-se anticorpos monoclonais e citocinas recombinantes murinas como amostras de referência.

As densidades ópticas (DO) foram mensuradas a 405 nm após 5 min da adição do substrato e cromógeno, utilizando-se um leitor de microplacas de ELISA (SpectraMax 250, Molecular Devices, USA).

3.5 Antígeno solúvel de *T. gondii*

Antígeno solúvel de formas de taquizoítos de *T. gondii* (STAg) foi obtido como previamente descrito (MINEO et al., 1980).

Exsudato peritoneal de camundongos infectados (cepa RH) foram lavados duas vezes em tampão fosfato de salina (PBS) e centrifugados a 720 g por 10 min em 4°C. Suspensões de parasitos foram ajustadas para 1×10^8 taquizoítos/mL, tratadas com inibidores de proteases (10 µg/mL aprotinina, 50 µg/mL leupeptina, e 1,6 mM fenilmetilsulfonilfluorido; todos da Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e, então, lisados por cinco ciclos de congelamento/descongelamento com posterior sonificação (seis ciclos à 60-Hz por 1 min cada) em gelo.

Após centrifugação a 10.000 g, por 30 min., a 4°C, o sobrenadante foi coletado e filtrado por meio de membrana de 0,2 µm (Corning Costar Corp., Cambridge, USA).

A concentração de proteína contida no STAg foi determinada pelo método de Lowry (1951) e alíquotas de 100 µL foram congeladas a -80°C.

3.6 Análise da produção de citocinas *ex vivo*

Esplenócitos foram macerados em meio RPMI e a suspensão foi lavada com meio, tratada com tampão de lise (0,16 M NH₄Cl e 0,17 M Tris-HCl, pH 7,5), lavados novamente e ressuspensos em meio RPMI contendo 10% de CSF. As células (2×10^5 /200µL/poço) foram cultivadas em quadruplicata em placa de cultura com 96 poços na presença de diferentes estímulos, LPS (Lipopolissacarídeo, 1 µg/ml; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA), antígeno solúvel de taquizoíto de *T. gondii* (STAg; em três dosagens 50, 25 e 10 µg/ml), ou somente meio e foram incubados a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 48 h, o sobrenadante sem células foi coletado e estocado a -70 °C até a quantificação de citocinas.

As mensurações de IL-10 e IFN γ foram realizadas por ELISA indireto de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). O limite de detecção foi de 31 pg/mL para ambas citocinas.

3.7 PCR quantitativo em tempo real

Amostras de diferentes tecidos (fígado, rim, músculo/quadríceps, intestino, testículo, pulmão, coração) foram coletadas após a eutanásia dos animais, no entanto somente as de cérebro foram analisadas.

A quantificação dos parasitos em cérebro foi determinada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), conforme descrito por Wahab et al. (2010). Os *primers* utilizados foram desenvolvidos para detecção da região repetitiva de 529 pares de base do *T. gondii* utilizando o sistema “SYBR green” (Invitrogen, San Francisco, CA). A extração do DNA foi realizada a partir de 20 µg do tecido (e.g.: cérebro), utilizando “Wizard SV Genomic DNA kit” (Promega Co., Madison, WI) de acordo com instruções do fabricante. A concentração do DNA total foi determinada por espectrofotômetro (260 nm) ajustando a concentração do DNA das amostras para 200 ng/µL. Os ensaios para determinar a quantificação do *T. gondii* foram realizados utilizando “StepOnePlus™ PCR Systems”(Applied Biosystems, Foster City, CA) com Master Mix (Promega Co., Madison, WI) juntamente com os *primers*, conforme instruções do fabricante.

Todas as reações foram conduzidas juntamente com amostras positivas realizando-se uma curva padrão em sete diluições seriadas 1:10 a partir de 100 ng do DNA do parasito. A quantificação dos parasitos foi calculada pela interpolação da curva padrão (10^2 a 10^{-7} ng) com equivalente de DNA do *T. gondii*.

Para o controle negativo os cérebros de camundongos não infectados foram analisados em paralelo.

3.8 Análises de imunohistoquímica

Parasitismo do tecido cerebral foi determinado por imunohistoquímica como previamente descrito por Silva et al., (2002b). Secções desparafinizadas foram incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio e com 0,2 M de tampão citrato (pH 6,0) em micro-ondas por ciclos de 7 min para resgate do sítios de antígenos. Em seguida, as secções foram bloqueadas com 2% de soro de cabra não imune e então com anticorpo primário (retirados do soro de camundongos infectados experimentalmente com *T. gondii*) diluído 1:1000 em PBS mais 1% de soro-albumina bovina.

Os controles negativos de secções de tecidos pareados foram incubados na ausência de anticorpos primários (somente o diluente) ou com soro de camundongo não imune. Subsequentemente, anticorpos biotinilados IgG anti-camundongo de cabra (1:300, Sigma) e complexo peroxidase de estreptavidina biotinilada (1:250; DAKO Corporation, Carpinteria, CA) foram adicionados e a reação foi desenvolvida com 0,03% de H₂O₂ e 3,3-diaminobenzidina tetraidroclorido (DAB; Sigma).

As lamínas foram coradas com hematoxilina de Harris e examinadas por microscopia de luz. Controles negativos de tecido cerebral foram incluídos de camundongos não infectados e não imunizados.

Cistos e parasitos totais do hemisfério esquerdo cerebral foram determinados por dois investigadores independentes, utilizando-se microscopia de luz (Nikon, lente objetiva de 40x).

3.9 Exercícios físicos

Foram realizados exercícios aeróbicos e resistidos durante pelo menos quatro semanas (conforme protocolo de experimento) com os grupos de animais envolvidos, de acordo com os procedimentos mencionados a seguir.

3.9.1 Exercício Aeróbico

Inicialmente, os camundongos realizaram uma fase de adaptação na esteira (Figura 22) de três sessões/semana de corrida a 14 m/min (velocidade moderada), com incremento progressivo de cargas. O tempo mínimo de treinamento foi de quatro semanas, dependendo do experimento.

Foi realizado também o experimento (duração de 8 semanas) aeróbico com velocidade de 20 m/min (C57BL/6, item 4.2) e 22 m/min (BALB/c, item 4.2).

As sessões foram elaboradas pelo autor da seguinte forma:

- a) **sessão 1:** os camundongos deveriam correr oito séries de dois minutos com um minuto de intervalo;

- b) **sessão 2:** os camundongos deveriam correr oito séries de três minutos com um minuto de intervalo;
- c) **sessão 3:** os camundongos deveriam correr seis séries com quatro minutos com um minuto de intervalo. Desta sessão em diante, em todas as demais sessões os camundongos deveriam correr seis séries de cinco minutos com um minuto de intervalo.

3.9.2 Exercício resistido

Assim como para os exercícios aeróbicos os exercícios resistidos contaram com a semana de adaptação, na qual os animais foram colocados no aparato de escalada (Figura 19) somente com o aparato de carga (Figura 20) afixado na calda, sem peso extra.

No primeiro dia da primeira semana pós-adaptação, os camundongos tiveram suas cargas máximas em uma só repetição (1 RM, uma repetição máxima) aferidas e em seguida foi colocada uma carga na calda iniciando-se com 60% do 1 RM, sendo aumentado até 80% durante a próxima reavaliação de 1 RM, que foi realizada semanalmente salvo após as infecções pós infecção.

O peso do aparato mais os das bolas de chumbo foram aferidas com balança digital (AUW220D, Shimadzu, Philippines).

A frequência utilizada foi de duas sessões/semana. Os camundongos realizaram pelo menos 12 séries com três à quatro minutos de descanso com apenas uma repetição em cada série, que teve uma duração de 14 à 15 segundos. Para os camundongos que não ficaram o tempo estipulado a repetição não foi considerada. Assim aqueles que conseguiram alcançar os 80% do 1 RM ou após a terceira sessão, tiveram seus 1 RM reavaliados.

3.10 Mensuração de peso e da temperatura

Os pesos dos camundongos foram aferidos semanalmente utilizando-se balança digital (AUW220D, Shimadzu, Philippines), exceto no penúltimo experimento em que tiveram seus pesos aferidos diariamente após a infecção.

Utilizando-se termômetro digital com infravermelho (TCI1000, Avita, Wujiang Co., LTD, China) as temperaturas dos camundongos foram aferidas somente no penúltimo experimento com frequência semanal até a infecção e após esta, realizada diariamente.

3.11 Análises estatísticas

Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Foram utilizados os testes paramétricos ou não paramétricos, quando apropriados. As comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste *t* de Student e para três ou mais grupos foi utilizado ANOVA com pós-teste de Bonferroni. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram comparadas pelo teste de Log-rank. Foi estabelecido o valor de $P \leq 0,05$ para as diferenças significativas.

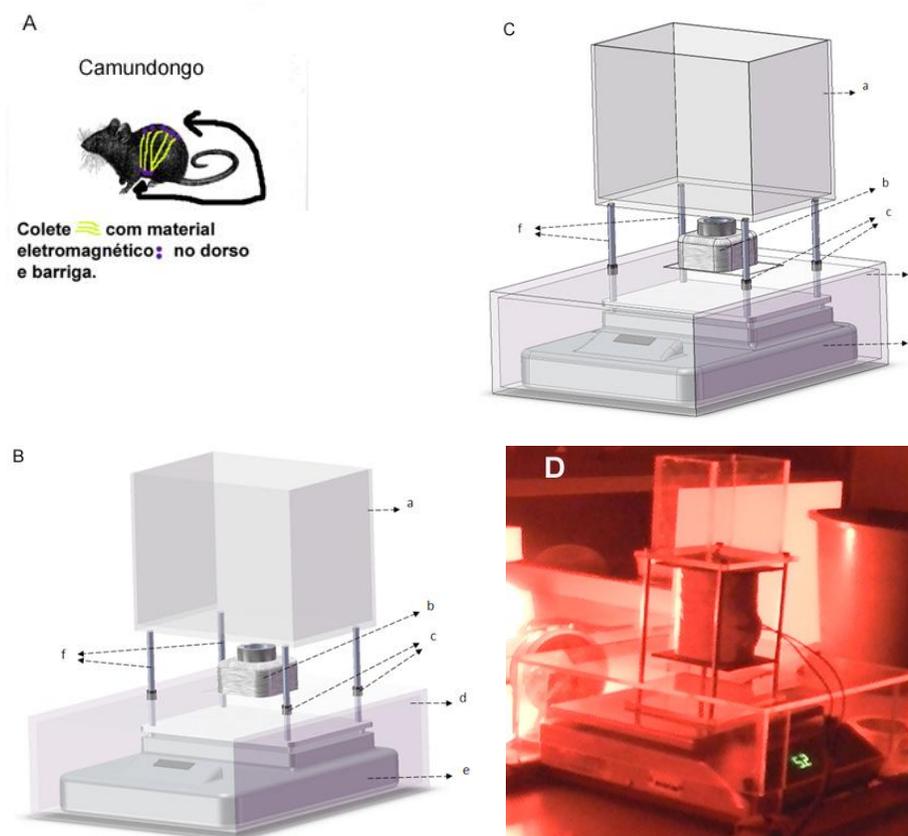
4 RESULTADOS

4.1 Pré experimentação

Os aparatos para realização dos treinamentos físicos (aeróbicos e resistidos) dos animais foram construídos no ano de 2011.

Para a construção da Gaiola Eletromagnética (Figura 17) a Empresa Junior da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) foi contratada, no entanto entregou somente as partes de acrílico e quebrou o contrato por não ter conseguido construir a bobina para geração do campo eletromagnético. Diante desta necessidade foi contratado um profissional liberal, Catarino Divino de Alcântara (Figura 55), que desenvolveu a bobina da gaiola eletromagnética (Figura 17 D). Este equipamento foi então testado sem os animais e funcionou perfeitamente. No entanto, ao ser testado com os animais experimentais não foi obtido êxito, uma vez que os animais não realizaram o exercício almejado (similar a flexões de braço para o ser humano).

Figura 17 - Desenho esquemático proposto e protótipo construído

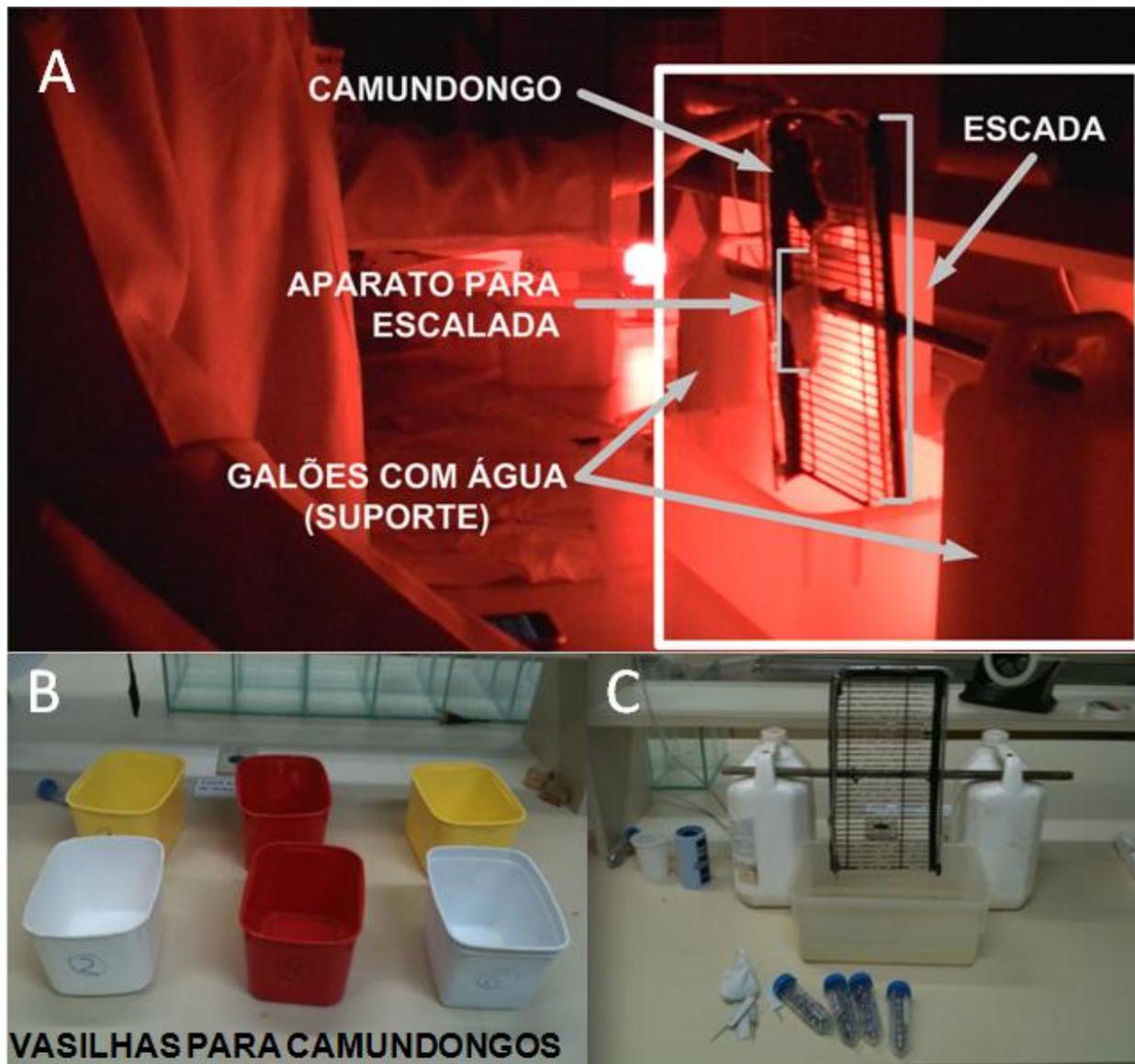


A – Modelo esquemático do material eletromagnético no corpo do camundongo. Logo antes do camundongo entrar na jaula eletromagnética foi colocado nele um colete com ímãs distribuídos em toda sua extensão principalmente na parte superior e inferior, como mostrado no desenho acima. B e C – Esquema geral 1 do projeto da gaiola eletromagnética. Vista lateral da gaiola com a parte de cima desacoplada. A gaiola foi desacoplada da parte inferior para facilitar o treinamento dos animais. a – Gaiola; b – Gerador de campo eletromagnético; c – Aparato para reduzir a “0” o atrito entre as hastes e o suporte; d – suporte; e – Balança de precisão; f – Hastes entre a balança e a gaiola. D – Protótipo da gaiola eletromagnética construído conforme desenho esquemático.

Fonte: Próprio autor, 2011.

Em seguida foi desenvolvido o protótipo do aparato de escalada (Figura 18 A e C) e produzido (Figura 19) em 2012 pelo prestador de serviços Kaio A. Lopes. Os aparatos para fixação da carga no camundongo foram produzidos (Figura 20) pelo autor em colaboração com Geni L. S. Bortolini (Figura 61).

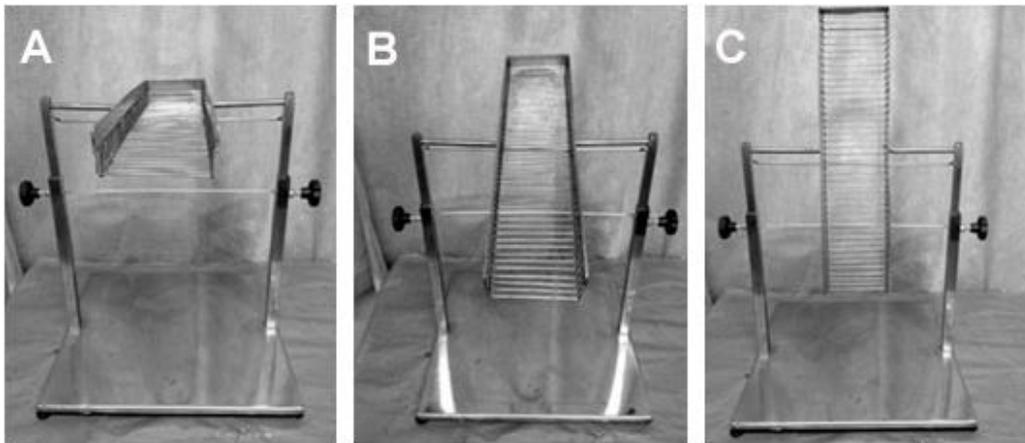
Figura 18 - Protótipo do aparato de escalada para exercício resistido



A e C, Protótipo de aparato de escalada para treinamento resistido. B, Vasilhas de contenção para deixar os camundongos durante o tempo de descanso. Os camundongos realizaram as 12 séries de exercícios resistidos (60-80% de 1RM). Eles deveriam subir este aparato ou ficar inertes (sem descer) de 14-15 segundos e sem que a carga encostasse nos degraus da escada.

Fonte: Próprio autor, 2012.

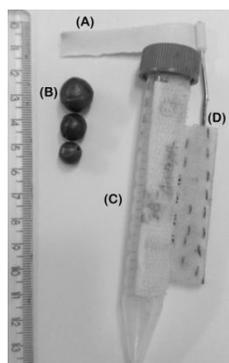
Figura 19 - Aparato de escalada para exercício resistido



Os camundongos realizaram o exercício resistido (60-80% of 1RM). Deveriam escalar este aparato ou ficar inerte de 14-15 segundos sem que a carga encostasse nos degraus do aparato.

Fonte: Próprio autor, 2012.

Figura 20 - Conjunto de aparatos que permite controlar a carga do treinamento resistido

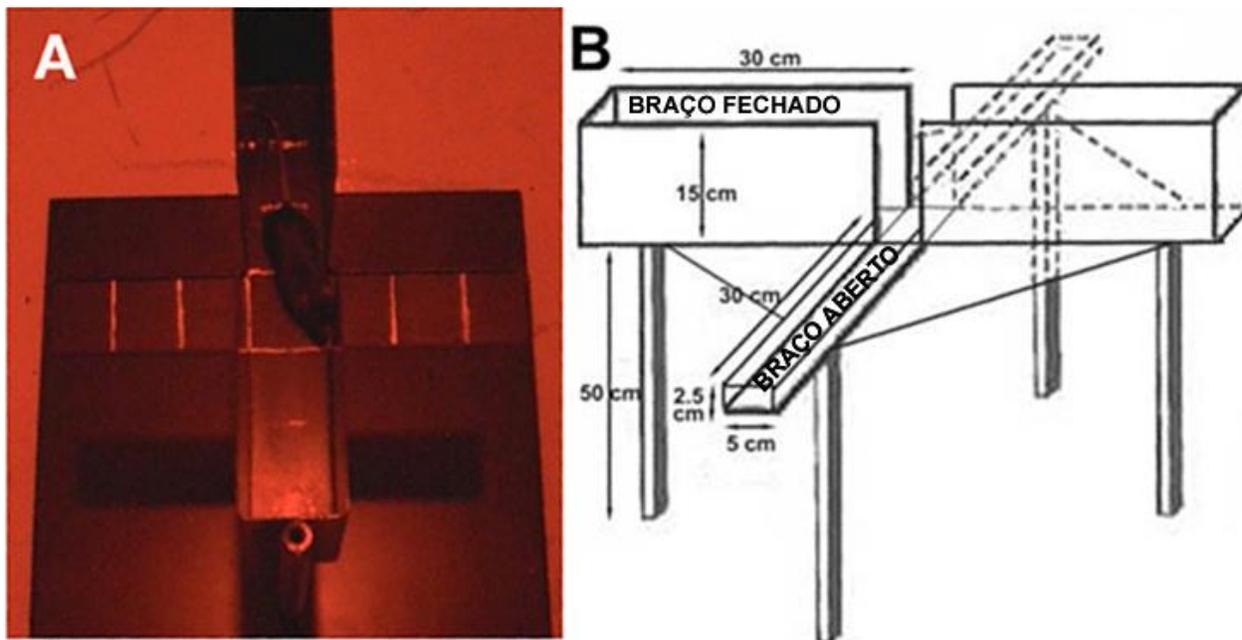


Tem-se da esquerda para direita os seguintes aparatos: (A) Esparadrapo, que era preso à calda do camundongo ao velcro (fêmea), item "D"; (B) Bolas de chumbo, que eram utilizadas como "peso", colocando-se dentro do item "C"; (C) Tubo "falcon" de 15 mL com velcro (macho) afixado na lateral, que foi fixado no camundongo através do item "D". Também foi usado como vasilha para colocação das bolas de chumbo; (D) velcro (fêmea), afixado em uma haste metálica com esparadrapo.

Fonte: Próprio autor, 2012.

O labirinto em cruz (Figura 21) também foi produzido por Kaio A. Lopes. Este labirinto foi testado, mas as gravações realizadas não tiveram os dados extraídos e tratados até o presente momento.

Figura 21 - Labirinto em Cruz

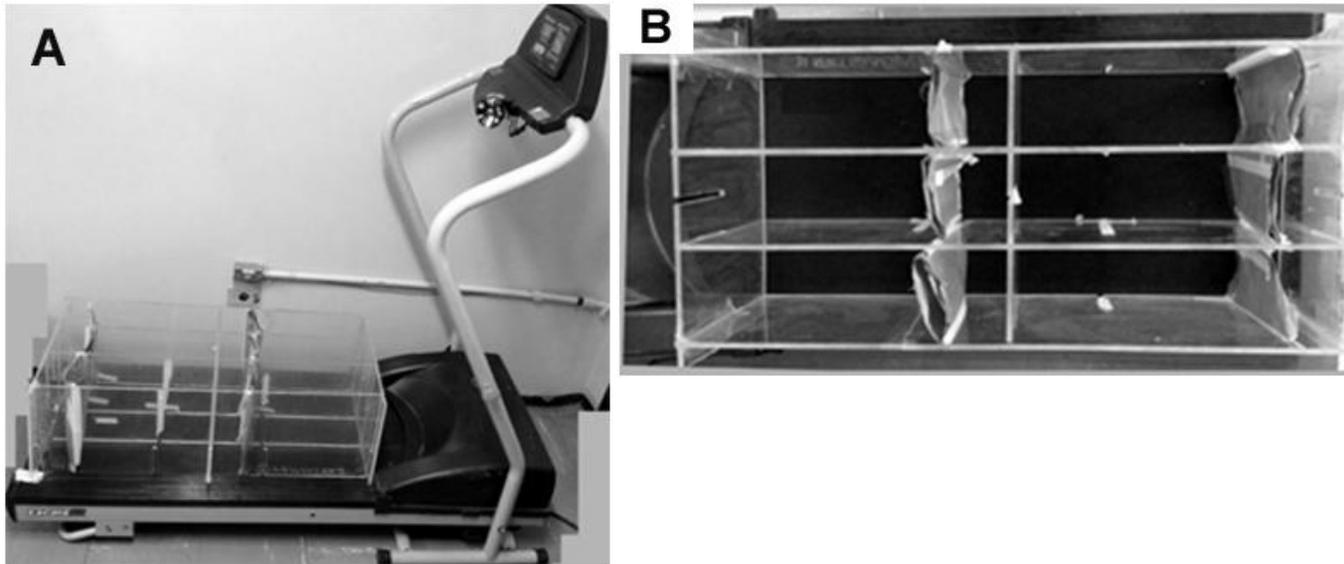


Labirinto em Cruz. A construção do labirinto foi adaptada de Lister (1987).

Fonte: Figura - A, Próprio autor, 2011; Figura - B, Jackson (2014)

A esteira para humanos (Figura 22) que passou por adaptações mecânicas, pelo prestador de serviços sr. Moacir José da Silva (Figura 57), foi adquirida em setembro de 2011.

Figura 22 - Esteira adaptada para camundongos (exercício aeróbico)



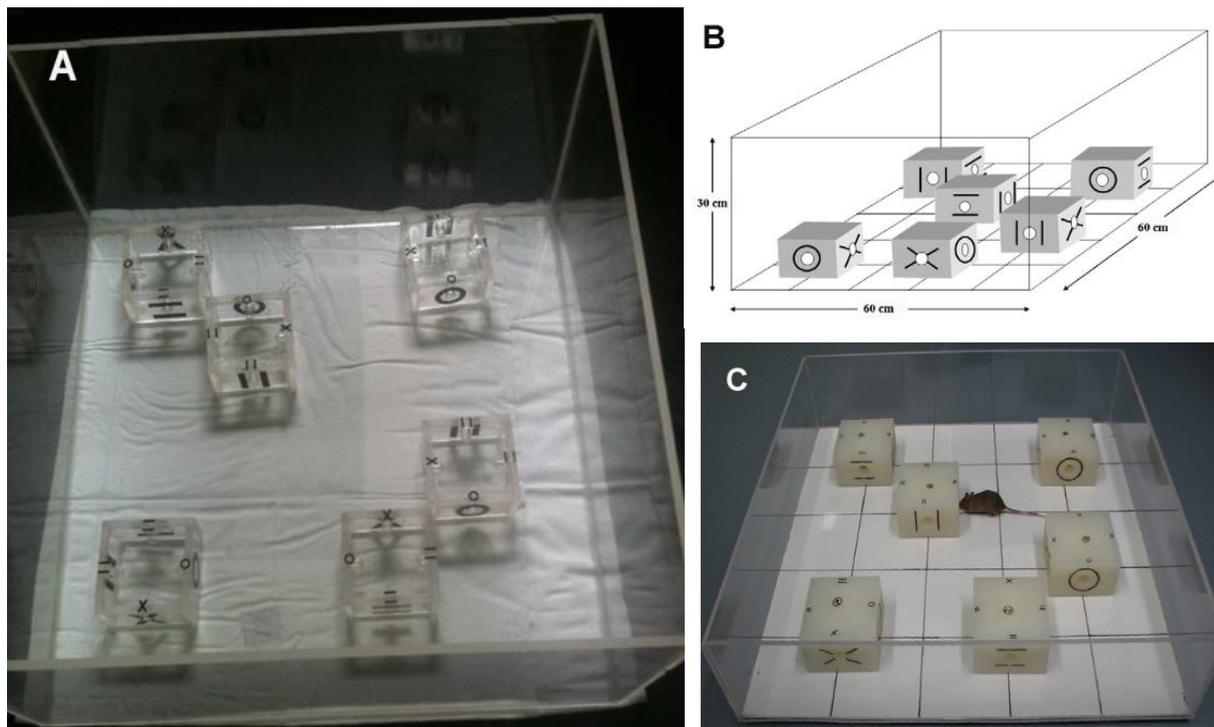
Os camundongos devem correr na velocidade posta aos mesmos. Eles podem receber toques delicados para incentivá-los à correr, mas isso não pode ser de forma frequente. Um papel de proteção foi colocado no acrílico para prevenir que os camundongos passem por baixo dele durante os testes.

Fonte: Próprio autor, 2011.

A aparato em acrílico, que compreende seis gaiolas para corrida simultânea de camundongos, foi planejado pelo autor em colaboração com Carlos Humberto de Oliveira (anexos Figura 54) e construído pelo autor (anexos Figura 56) no ano de 2011.

Tomando como referência o desenho esquemático já publicado (WOOD; GLYNN; MORTON, 2011) do labirinto "nada e cruz" (Figura 23) foi construído o aparato (Figura 56) para mensuração da capacidade de aprendizado dos animais experimentais.

Figura 23 - Labirinto "nada e cruz"



A - Labirinto "nada e cruz" construído por mim baseado em (WOOD et al., 2011), B e C - respectivamente, figuras esquemática e real do labirinto "nada e cruz" de Wood et al. (2011).

Fonte: Figura A - Próprio autor, 2011; Figuras - B e C, Wood et al. (2011).

4.2 Experimento 1: teste do exercício aeróbico

Com o objetivo de padronizar os exercícios aeróbicos e testar a quantidade de 10 cistos, o primeiro experimento foi executado. Camundongos (n=24) BALB/c (♂) foram divididos em quatro grupos (n=6 cada grupo), sendo dois treinamento (IEx, infectado exercitado e NIEEx, não infectado exercitado) e dois sedentários (IS, infectado sedentário e NIS, não infectado sedentário).

Houve uma semana de adaptação (da quinta a sexta semana de vida) em que os camundongos foram colocados na esteira, sem o funcionamento da mesma. Os camundongos iniciaram o treino aeróbico na sexta semana de vida e continuaram até a 12ª semana, com frequência de cinco vezes por semana. A velocidade inicial foi 12 m/min sendo aumentada semanalmente em 2 m/min até 18 m/min de forma contínua por 30 minutos.

A infecção foi realizada com 10 cistos de *T. gondii*, da cepa ME49. No 30º dia após a infecção realizou-se a eutanásia por deslocamento cervical.

Os animais terminavam os exercícios, mas na metade dos treinos até a finalização eles se apoiavam muito no acrílico da parte traseira das gaiolas, correndo risco de lesão e/ou vida. Não foi constatado diferença na pelagem dos animais. Apenas um camundongo morreu ao passar por debaixo do acrílico. Assim foi necessário a fixação de um papel no acrílico, para prevenir futuros acidentes.

4.3 Experimento 2: teste de susceptibilidade ao *T. gondii* de duas linhagens de camundongos (C57bl/6 e BALB/c) com treinamento prévio

Este experimento objetivou: verificar a susceptibilidade dos camundongos exercitados e sedentários frente à infecção por *T. gondii*, verificar qual modelo animal (BALB/c ou C57BL/6) seria melhor para a realização dos experimentos futuros (em que camundongos serão previamente treinados e após algumas semanas serão infectados) e testar efetivamente o aparato de treinamento resistido (Figura 18).

A infecção foi realizada por via oral com 10 cistos para os C57BL/6 e com 40 para os BALB/c.

Para este experimento formulou-se as seguintes hipóteses: se os camundongos exercitados (BALB/C ou C57BL/6) comparados com os sedentários teriam menos infecção no cérebro em comparação ao *T. gondii* e se o modelo animal C57BL/6 teria melhor modelo para a realização dos experimentos de infecção após várias semanas de treinamento, uma vez que C57BL/6 são classicamente mais susceptíveis ao *T. gondii* que os BALB/c. Além disso também pretendia-se testar o aparato de escalada, assim como padronizar protocolo de treinamento.

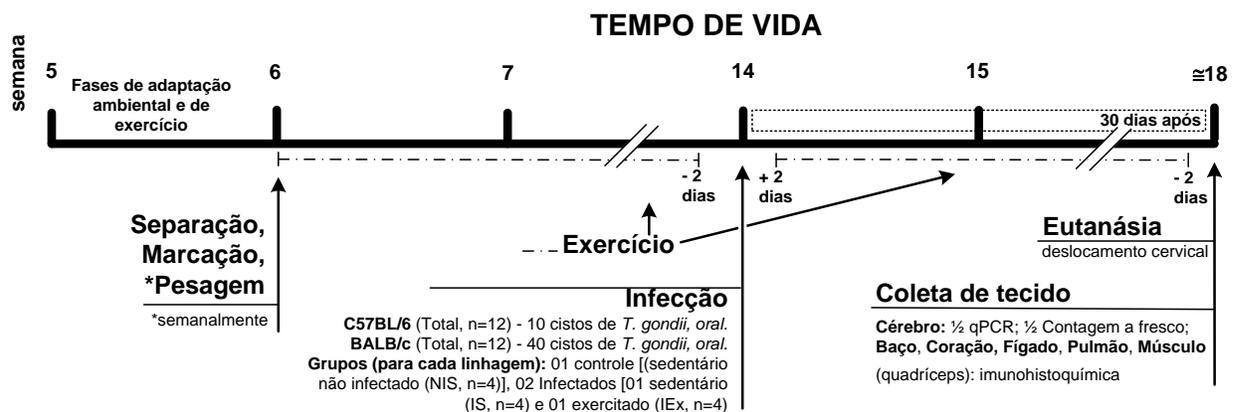
Para os exercícios resistidos o protocolo utilizado foi similar ao item 3.9.2, exceto o fato de se realizarem 15 repetições. Para o exercício aeróbico o protocolo foi similar ao item 3.9.1, exceto que a duração total do treino foi de 40 minutos e que houve aumento da velocidade de forma gradual toda semana.

No exercício aeróbico os camundongos C57BL/6 alcançaram 20 m/min na última semana de treinamento e os BALB/c chegaram a 22 m/min no mesmo período. Pode-

se verificar no desenho experimental geral (Figura 24) que apresenta o respectivo resumo esquemático.

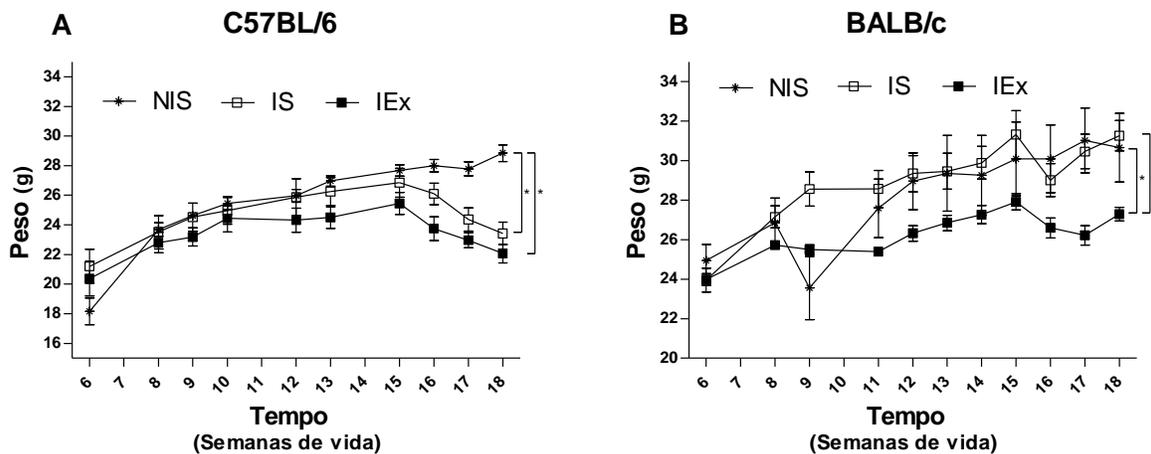
Para este experimento não foram realizadas as análises de qPCR para quantificação de carga parasitária, pois o equipamento ainda não havia sido instalado. A imunohistoquímica não foi realizada.

Figura 24 - Desenho esquemático do experimento 2



A aferição do peso corporal dos camundongos mostrou que para os animais após a infecção, como esperado, houve redução de peso (Figura 25) para os C57BL/6 com diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos não infectado sedentário (NIS) e os infectados (Exercitado, IEx e Sedentário, IS). No entanto, para os BALB/c, o grupo infectado exercitado (IEx, n=4) teve o menor peso entre os três grupos e não houve diferenças entre os grupos controle e sedentário infectados.

Figura 25 - Peso dos camundongos C57BL/6 e BALB/c ao longo do tempo para o experimento 2

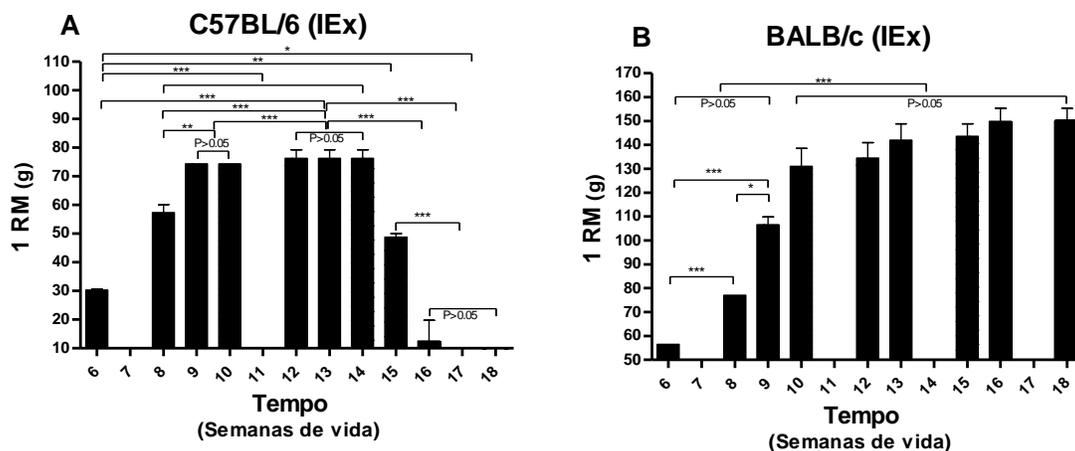


Pesagem ao longo do experimento dois. Pesagem iniciada na 6ª semana (infecção 14ª semana) até o final. A - Diferenças ($*P < 0.05$) foram encontradas entre o grupo controle [Sedentário não Infectado (NIS, $n=4$)] e os infectados [Exercitado (IEx, $n=4$) e Sedentário (IS, $n=4$)]. B - Diferenças ($*P < 0.05$) foram encontradas entre o grupo infectados exercitado (IEx, $n=4$) versus os grupos controle [Sedentário não Infectado (NIS, $n=4$)] e Infectado sedentário (IS, $n=4$). Os C57BL/6 receberam 10 cistos e os BALB/c 40. Não houve diferença estatística entre os sedentários ($P > 0,05$). Dados expressos em média \pm SEM.

Para a avaliação de força dos camundongos infectados exercitados (IEx) C57BL/6 e BALB/c utilizando 1 RM, o dado mais expressivo foi a diminuição do 1 RM para valores abaixo do inicial para os C57BL/6. Sendo que após a infecção estes animais diminuíram significativamente o 1 RM ($***P < 0.0001$). Não houve avaliações de força nas semanas 7, 11 e 17 para os C57BL/6 e 7, 11, 14 e 17 para os BALB/c.

Os camundongos BALB/c tenderam a afixar seus dentes na escada facilitando os exercícios, uma vez que seus dentes são afixados na caixa craniana. A inibição deste ato foi feita através do pressionamento para a retirada dos dentes, sendo realizado este procedimento todas as vezes, até a adaptação dos mesmos animais. Caso este ato fosse identificado e os camundongo havia tido vantagem nas avaliações de 1 RM, o teste era desconsiderado e repetido após um tempo mínimo de 3 minutos.

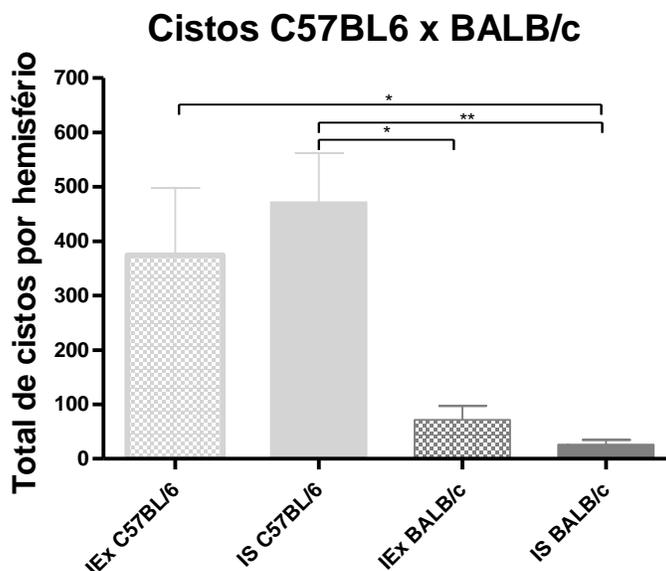
Figura 26 - Avaliação de uma repetição máxima (1 RM) de camundongos C57BL/6 e BALB/c



Experimento 2. Avaliação de força dos camundongos infectados exercitados (IEx) C57BL/6 (10 cistos) e BALB/c (40 cistos) utilizando 1 RM. Não houve avaliações nas semanas 7, 11 e 17 para os C57BL/6 e 7, 11, 14 e 17 para os BALB/c. As diferenças, quando aplicadas estão expressas em * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.0001$. O dado mais expressivo foi a diminuição do 1 RM para valores abaixo do inicial para os C57BL/6. Sendo que após a infecção estes animais diminuíram significativamente o 1 RM (*** $P < 0.0001$). Dados expressos em média \pm SEM.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes intralinhagem ($P > 0,05$), no que se refere ao total de cistos de *T. gondii* (ME49 cepa) por hemisfério cerebral de camundongos C57BL/6 e BALB/c comparando-se os grupos exercitados (IEx) versus os sedentários (IS). Estes dados foram semelhantes à outros de experimento realizado posteriormente.

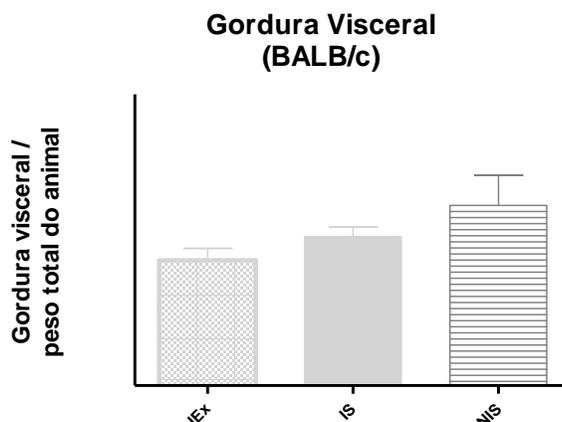
Figura 27 - Contagem de cistos a fresco em cérebro de camundongos C57BL/6 versus BALB/c



Total of cistos de *T. gondii* (ME49 cepa) por hemisfério cerebral de camundongos C57BL/6 e BALB/c, grupos exercitados (IEx) e sedentários (IS). Contagem a fresco realizada por dois independentes avaliadores. Não foram encontrados diferenças estatisticamente significantes intra linhagem ($P > 0,05$). O grupo IS BALB/c foi diferente estatisticamente que os grupos C57BL/6 (IEx, $*P < 0,05$ e IS, $**P < 0,01$). O grupo IS C57BL/6 foi também diferente do grupo IS BALB/c ($*P < 0,05$). Dados expressos em média \pm SEM.

No que se refere a aferição (g) da gordura visceral (gordura visceral por peso total do camundongo), não houve diferenças estatísticas significantes ($P > 0,05$) para os BALB/c (Figura 28). Os dados dos C57BL/6 foram perdidos e por isso foram suprimidos. Devido ao grande tempo gasto para coleta deste parâmetro secundário, futuras coletas de gordura visceral não foram realizadas. No entanto, pode ser um fator de pesquisas futuras, simultaneamente com exercício e infecção por *T. gondii*.

Figura 28 - Gordura visceral de camundongos BALB/c frente a infecção por *T. gondii*



Pesagem foi realizada no 30º onde ocorreu a eutanásia. O peso total da gordura visceral foi dividido pelo peso total corporal realizado no dia da eutanásia. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). Infectado Exercitado (IEx, $n=4$), Infectado Sedentário ($n=4$), Sedentário não infectado ($n=3$). Dados expressos em média \pm SEM.

4.4 Experimento 3: susceptibilidade de camundongos BALB/c ao *T. Gondii* dose-dependente de cistos

Neste experimento objetivou-se verificar a susceptibilidade dos camundongos (BALB/c) sedentários frente à infecção por *T. gondii* com diferentes quantidades de cistos (50, 75 e 100). A verificação da dose mais adequada de cistos fez-se necessária, uma vez que, no 30º dia de infecção a contagem dos cistos a fresco resultou em valores baixos de cistos (Figura 27).

A quantidade de homogeneizado utilizado para fazer a contagem dos cistos foi de 20 μ L, com a infecção com 40 cistos (experimento anterior). Sendo que a contagem em uma lâmina, com muita frequência, mostrou valores próximos de zero, o que poderia levar a erro nesta contagem. Baseado em Terrazas et al. (2010), esperava-se que a quantidade de 100 cistos fosse muito lesiva, sendo a de 50 ou de 75 cistos mais adequada para se infectar os BALB/c para futuros experimentos.

Figura 29 - Modelo esquemático do experimento 3

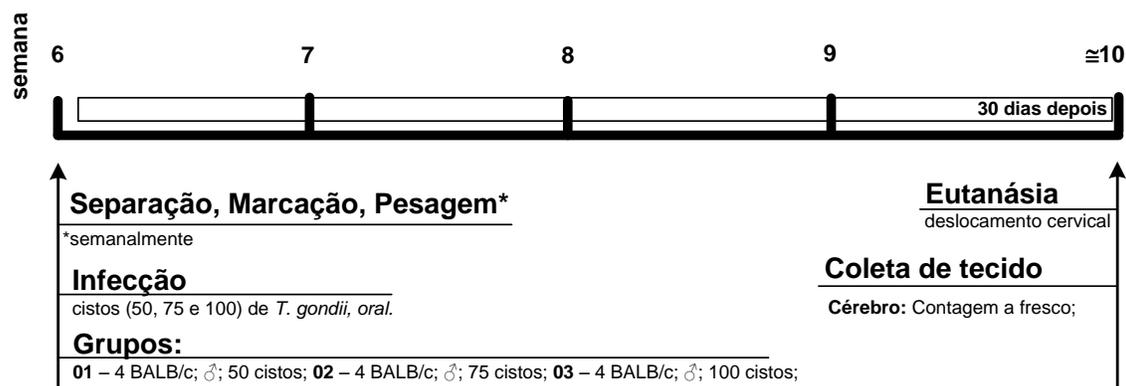
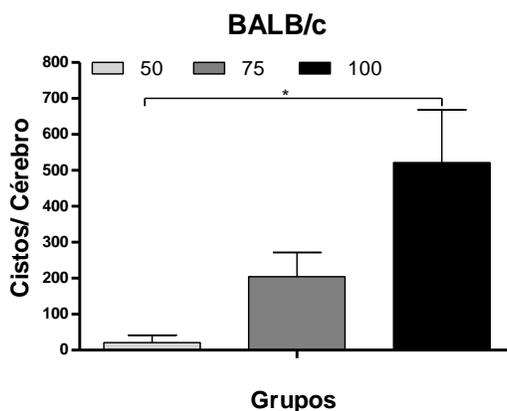


Figura 30 - Quantidade de cistos no 30º dia após infecção para o experimento 3



Quantificação da carga parasitária por contagem à fresco (ver item 3.2). Para a carga parasitária foram encontradas diferenças significativas (* $P < 0.05$) entre o grupo que foi infectado com grupos 50 cistos ($n=4$) e comparado com o infectado com 100 ($n=4$). Dados expressos em média \pm SEM.

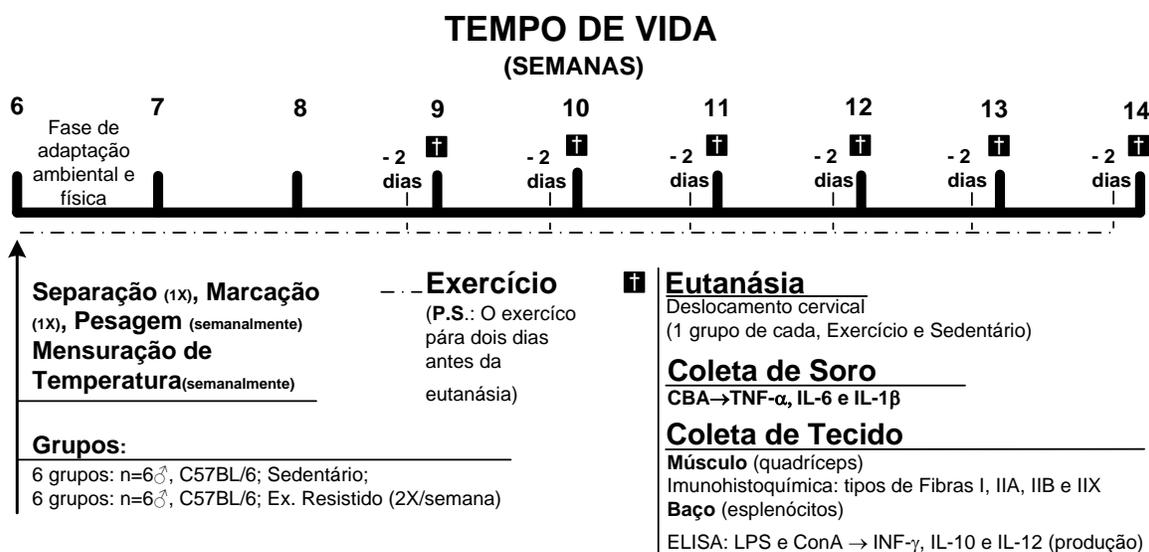
Os achados mostraram que quando comparados a carga parasitária cerebral em camundongos C57BL/6 (experimento 2) infectados com 10 cistos (Figura 27) com os animais BALB/c do experimento 3, infectados com 75 cistos (Figura 30). Além dessa correspondência, encontrou-se uma possível relação de dose-dependência entre a quantidade de cistos na infecção com carga parasitária cerebral após 30 dias de infecção, uma vez que com o aumento na quantidade de cistos de 50 para 100 na infecção, houve um aumento na carga parasitária cerebral nos camundongos (Figura 30).

Foram identificados problemas com a pesagem dos camundongos neste experimento sendo estes dados suprimidos.

4.5 Experimentos 4 e 5: validação do aparato de escalada para hipertrofia

Os experimentos 4 (C57BL/6) e 5 (BALB/c) objetivaram validar o aparato de escalada (Figura 31) para o processo de hipertrofia. Não foi possível finalizar estes experimentos devido à contaminação do CBEA-UFU (Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia) com helminto (*Syphacia obvelata*). Desta forma, para os próximos dois experimentos os animais foram adquiridos do Biotério Central da USP (Campus Ribeirão Preto-SP) até que o Biotério/UFU pudesse garantir a qualidade nos procedimentos experimentais.

Figura 31 - Modelo esquemático dos experimentos 4 e 5



4.6 Experimento 6: teste de susceptibilidade ao *T. gondii* de camundongos C57bl/6 com treinamento prévio

Este experimento objetivou verificar a susceptibilidade de camundongos exercitados e sedentários frente à infecção por *T. gondii* utilizando-se exclusivamente animais (C57BL/6), mais susceptível ao parasito (Figura 22).

Este experimento contou com dois grupos a mais que o experimento 2, um foi o controle exercitado sem infecção (NIEx) e o outro foi o grupo infectado que parou de treinar dois dias antes da infecção (IEx). Este grupo teve o intuito de ser o controle extra do grupo infectado que fez o exercício durante todo o experimento (IEx+30). Anteriormente denominado IEx, para este experimento assim como no próximo o será denominado de IEx+30.

Figura 32 - Experimentos 6. Desenho esquemático do experimento

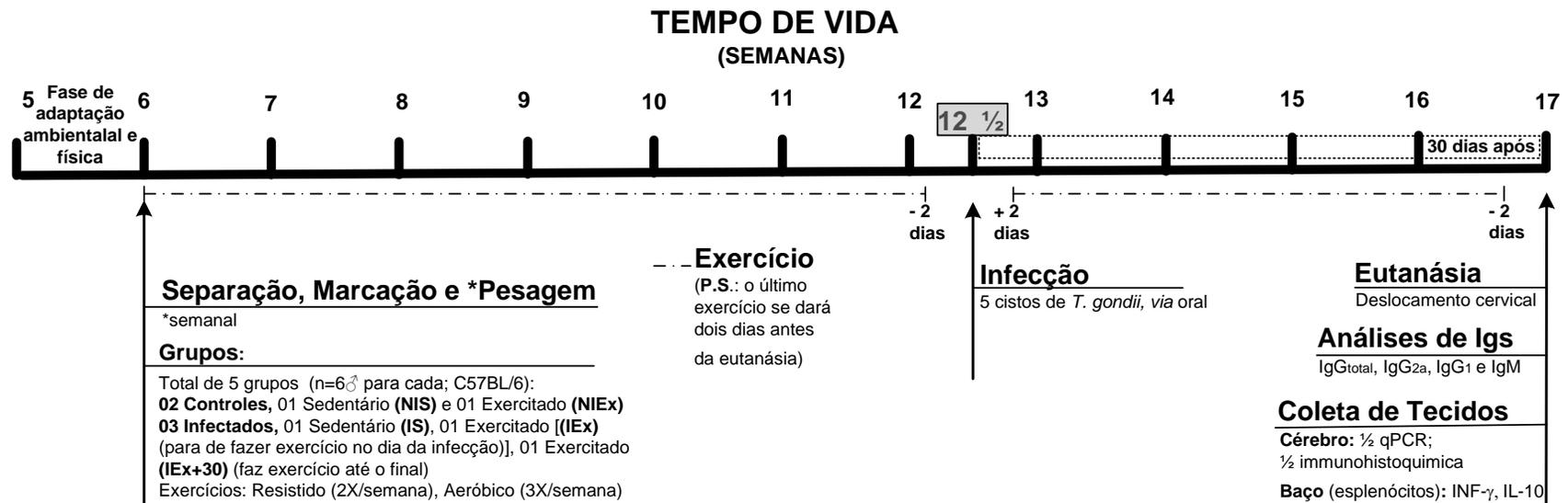
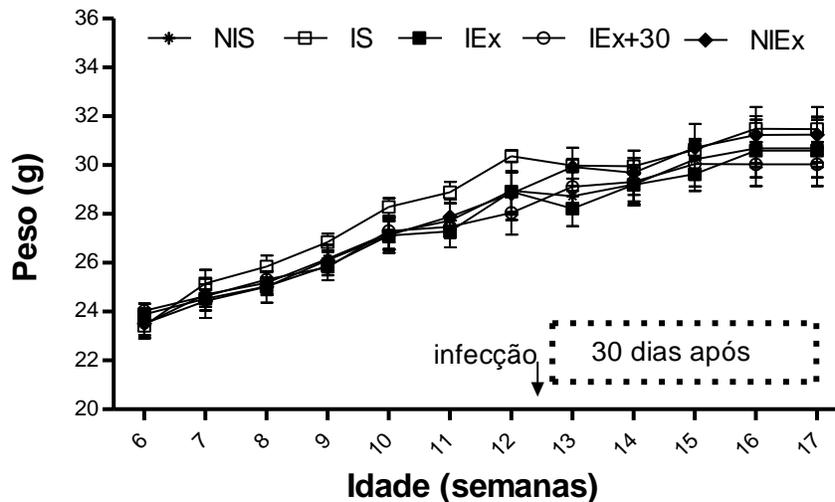


Figura 33 - Peso dos camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 6

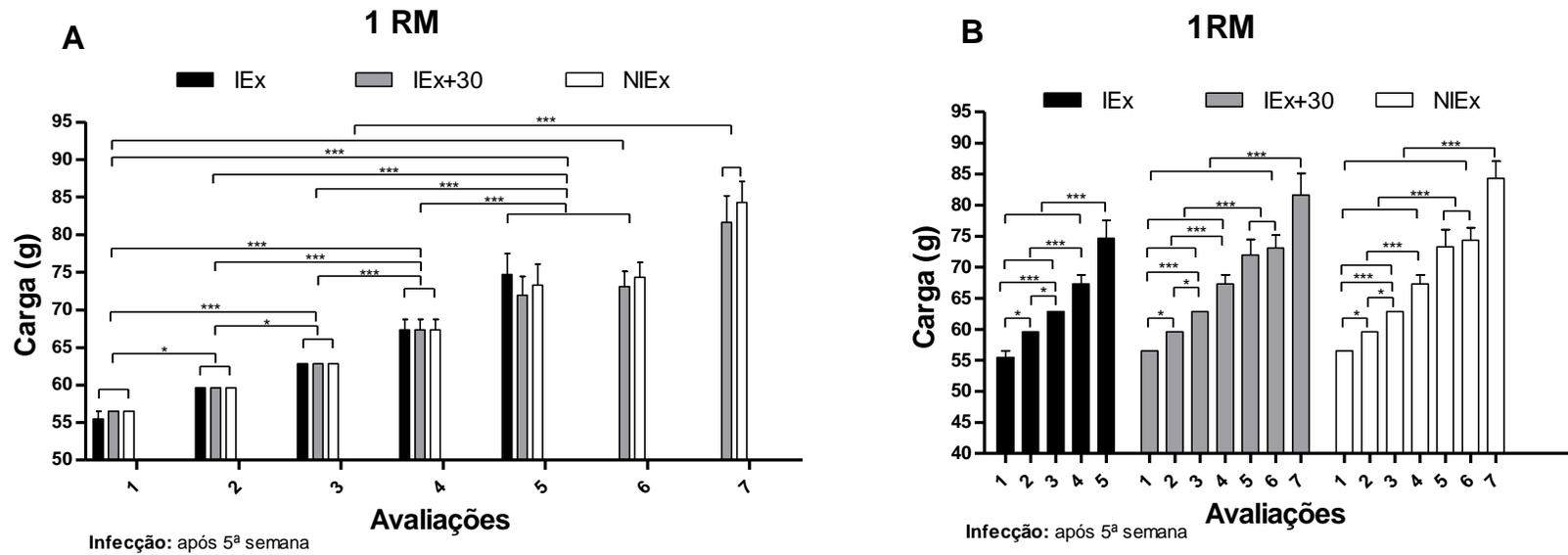


Pesagem ao longo do experimento seis. Pesagem iniciada na 6ª semana (infecção 12,5ª semana) até o final. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos controle [Sedentário não Infectado (NIS, $n=6$); Exercitado não infectado (NIS, $n=6$)] e os infectados [Exercitado (IEx, $n=6$); Exercitado mais trinta dias (IEx+30, $n=6$); e Sedentário (IS, $n=6$)]. Dados expressos em média \pm SEM.

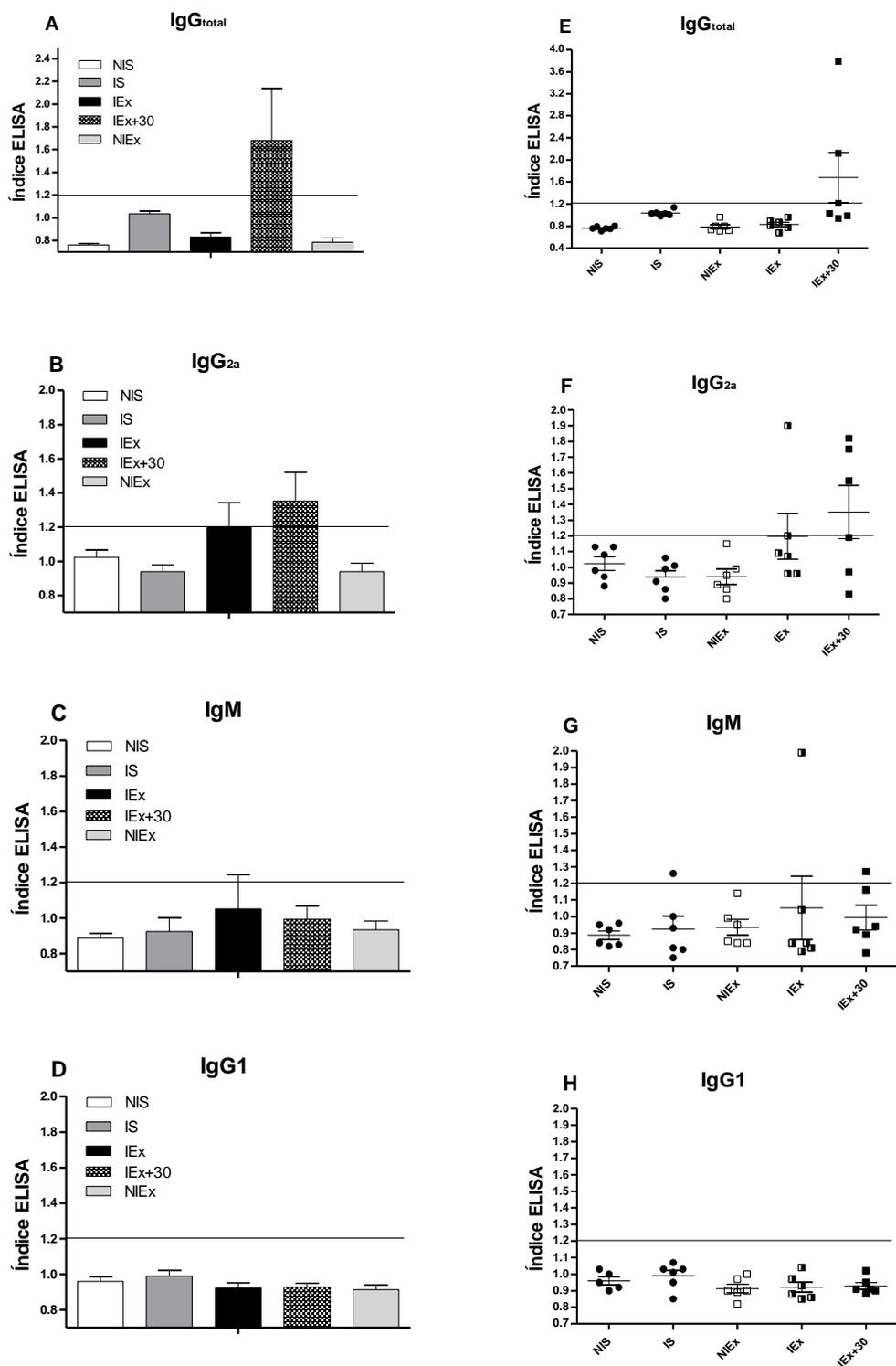
Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) no peso dos camundongos em nenhum tempo avaliado.

As avaliações de carga máxima (1 RM) foram realizadas (Figura 34) e seus resultados apontaram para a confirmação da validação do aparato para ganho de força.

Figura 34 - Avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 6



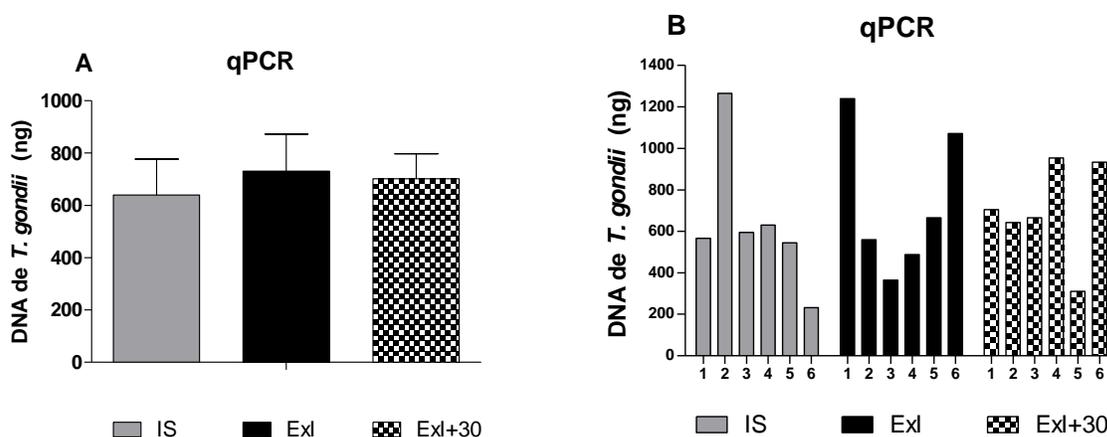
Experimento 6. Avaliações de força dos camundongos Exercitados [infectados (IEx, n=6), infectados exercitado por mais 30 dias após a infecção (IEx+30, n=6) e não infectados (NIEEx, n=6)]. Durante todo o experimento foram realizada somente 7 avaliações, sendo a 5ª logo antes da infecção e a última (7ª) na semana da eutanásia. Todas as avaliações entre todas as semanas, exceto 5ª para 6ª, tiveram diferenças significativas (**P<0.0001 ou *P<0.05) intragrupo. Nenhuma diferença estatística significativa (P> 0,05) foi encontrada intergrupos (NIS, IEx ou IEx+30) . Mesmo após a infecção (avaliação 5) houve ganho de força entre os grupos. Dados expressos em média ± SEM.

Figura 35 - Índice ELISA de Inmunoglobulinas anti-*T. gondii* para o experimento 6

Experimento 6. Teste de soroconversão (ELISA) 30 dias após a infecção de diferentes imunoglobulinas (IgG_{total}, IgG_{2a}, IgM e IgG₁). Grupos: Controle [Sedentário não infectado (NIS, n=6) e Exercitado não infectado (NIEx, n=6)] e grupos infectados [Sedentário (IS, n=6) e Exercitado (IEx, n=6) e Exercitado mais 30 dias de treino (IEx+30, n=6)]; O *Cutoff* foi considerado ser 1,2 (Índice ELISA). Não houve diferença significativa para nenhum grupo ($P>0,05$). Dados são expressos em média \pm SEM.

Não houve soroconversão (IgG_{total}) para os animais neste experimento (Figura 35). No entanto, quando a quantificação da carga parasitária individual foi realizada por qPCR (Figura 36 - B), todos os animais apresentavam cistos cerebrais, demonstrando a eficácia da infecção. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos exercitados (IEx e IEx+30) e o sedentários [(IS) (Figura 36 - A)].

Figura 36 - Quantificação de DNA de *T. gondii* para o experimento 6



Experimento 6. Total de *T. gondii* (ME49 stain), em ng de DNA, por cérebro de C57BL/6. A - Nenhuma diferença estatística foi encontrada ($P>0,05$) entre os grupos, infectado sedentário (IS, n=6), infectado exercitado (IEx, n=6) e infectado exercitado mais 30 dias (IEx+30, n=6). B- Todos os animais infectados apresentaram positividade para *T. gondii*. Animais não infectados, foram utilizados como controles negativos. Dados são representados em média \pm SEM.

As outras análises que estavam previstas não foram realizadas, uma vez que não houve soroconversão clássica (ELISA) satisfatória.

4.7 Experimento 8: teste de susceptibilidade de camundongos C57bl/6, com treinamento prévio, ao *T. gondii* utilizando diferentes quantidades de cistos (5, 10 e 15)

Este experimento (Figura 37) objetivou mimetizar o experimento 7, sendo acrescentadas diferentes dosagens de cistos, conforme discutido também para o experimento 3 realizado com BALB/c. As concentrações de cistos *T. gondii* utilizadas para infecção foram de 5, 10 e 15 cistos.

Figura 37 - Experimentos 8: modelo esquemático

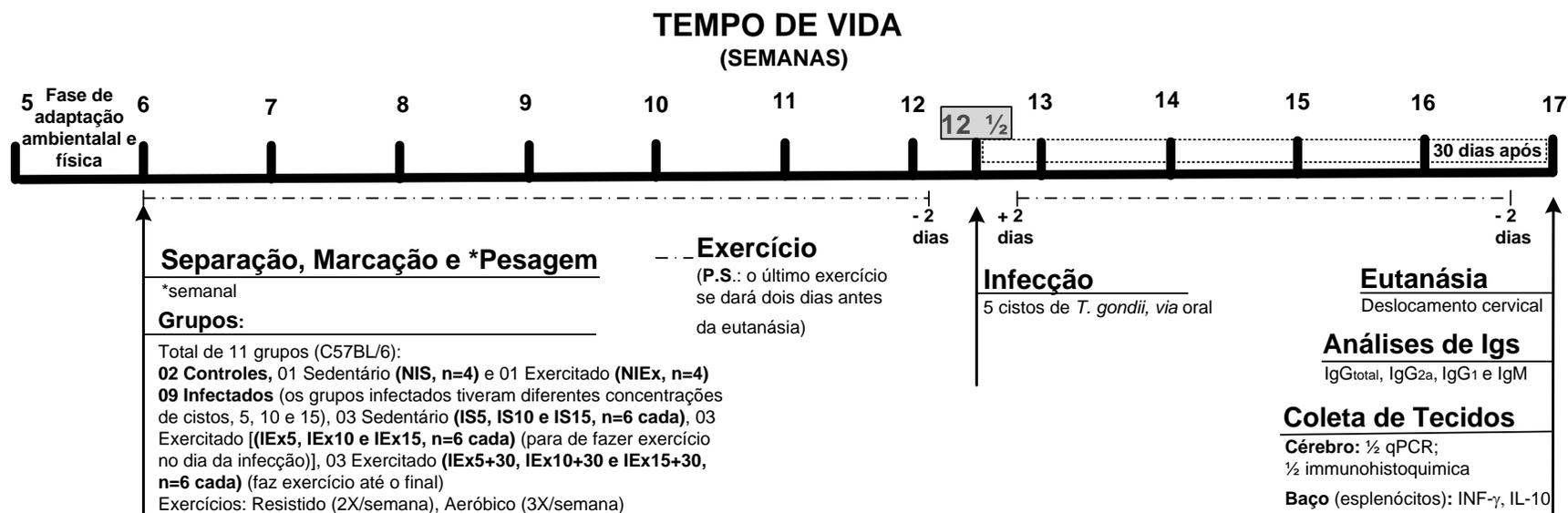
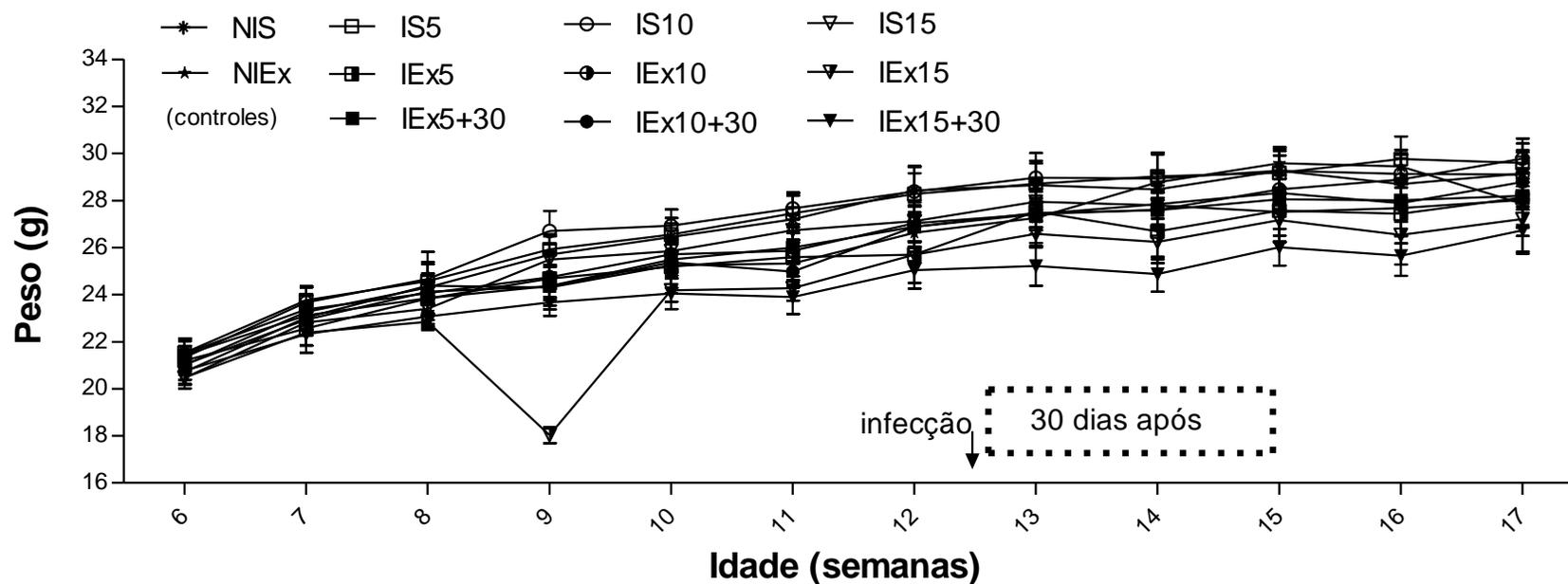


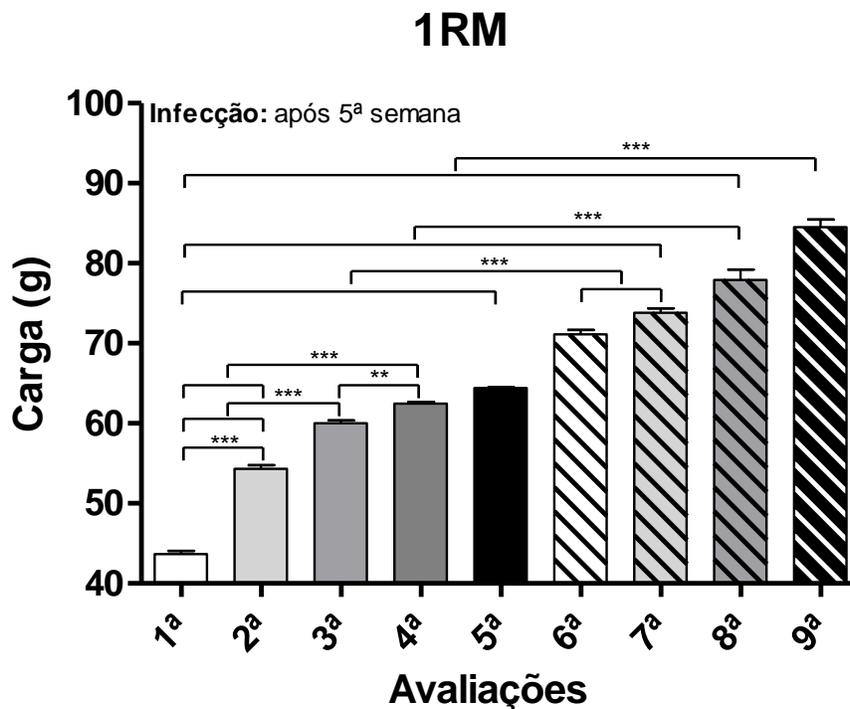
Figura 38 - Peso dos camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 8



Pesagem ao longo do experimento seis. Pesagem iniciada na 6ª semana (infecção 12,5ª semana) até o final. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos 02 controle [Sedentário não Infectado (NIS, $n=4$); Exercitado não infectado (NIS, $n=4$)] e os nove infectados [Sedentário (IS5, IS10 e IS15, $n=6$ cada), Exercitado (IEx5, IEx10 e IEx15, $n=6$ cada); Exercitado mais trinta dias (IEx5+30, IEx10+30 e IEx15+30, $n=6$ cada)]. Dados expressos em média \pm SEM.

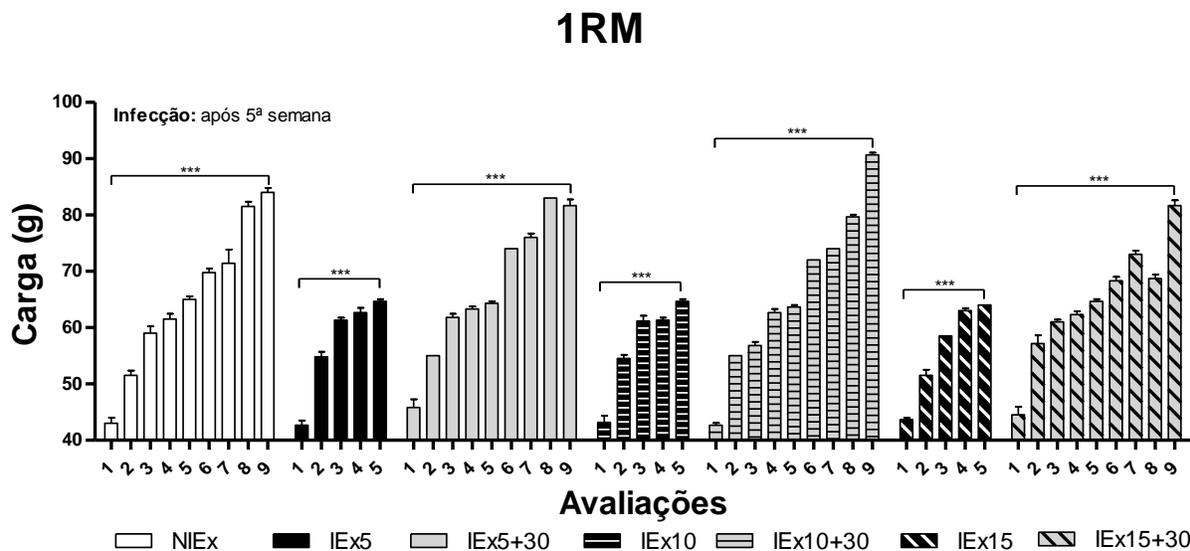
Referente ao peso (Figura 38) não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre todos os grupos para nenhuma semana deste experimento. Exceto na 9ª semana para o grupo IEx15 que foi devido a falta de água para estes animais no dia prévio a aferição, sendo a falta reestabelecida na 10ª semana.

Figura 39 - Avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo para o experimento 8



Experimento 8. Avaliações de força de todos os camundongos exercitados: controle [Exercitado não infectado (NIS, n=4)] e os seis infectados [Exercitado (IEx5, IEx10 e IEx15, n=6 cada); Exercitado mais trinta dias (IEx5+30, IEx10+30 e IEx15+30, n=6 cada)]. Dados expressos em média \pm SEM. Durante todo o experimento foram realizadas 9 avaliações, sendo a 5ª semana logo antes da infecção e a última (9ª) na semana da eutanásia. Camundongos foram infectados com 12,5 semanas de idade com 5, 10 e 15 cistos, conforme indicado nos grupos. Todas as avaliações entre todas as semanas, exceto 4ª para 5ª e 6ª para 7ª, tiveram diferenças significativa (** $P < 0.01$) ou (***) $P < 0.0001$). Mesmo após a infecção (avaliação 5) houve ganho de força entre os grupos. Dados expressos em média \pm SEM.

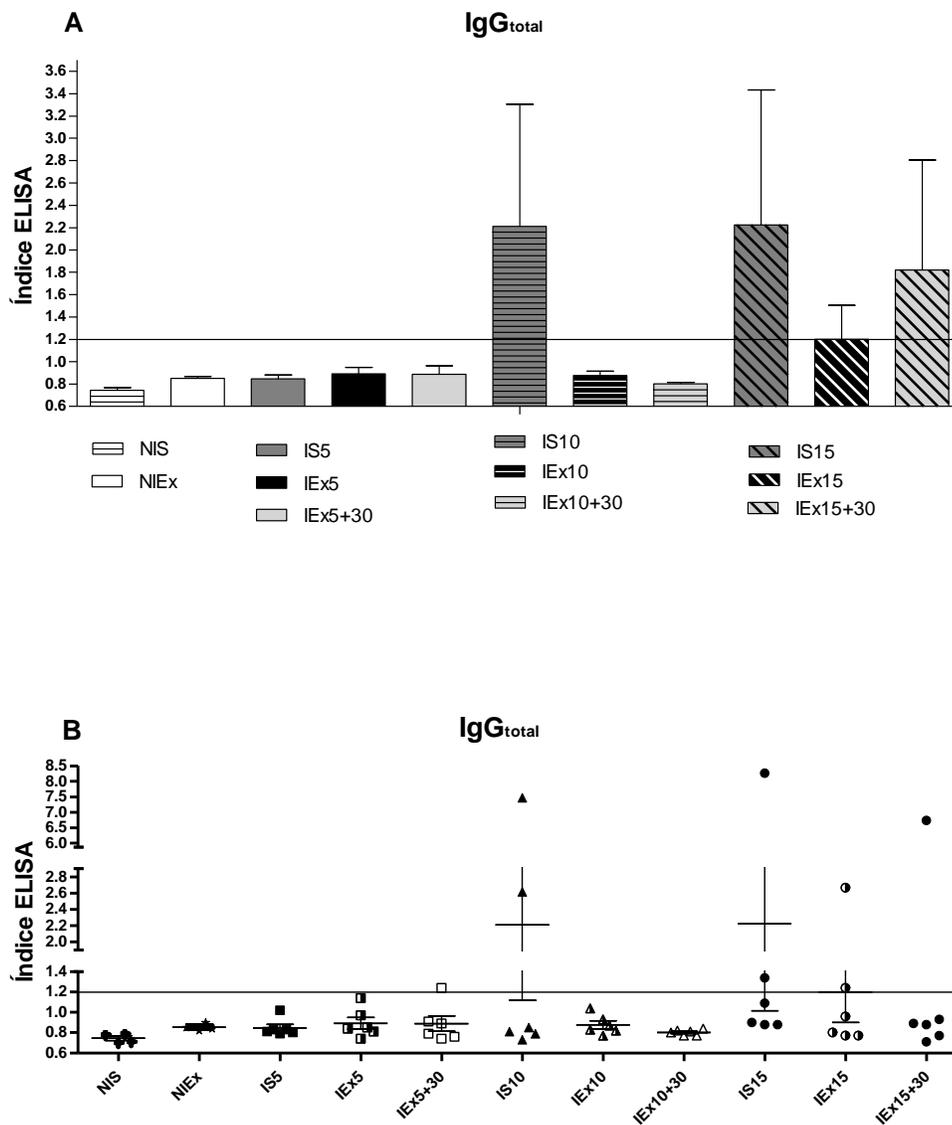
Figura 40 - Avaliação de força de camundongos C57BL/6 em seus respectivos grupos ao longo do tempo para o experimento 8



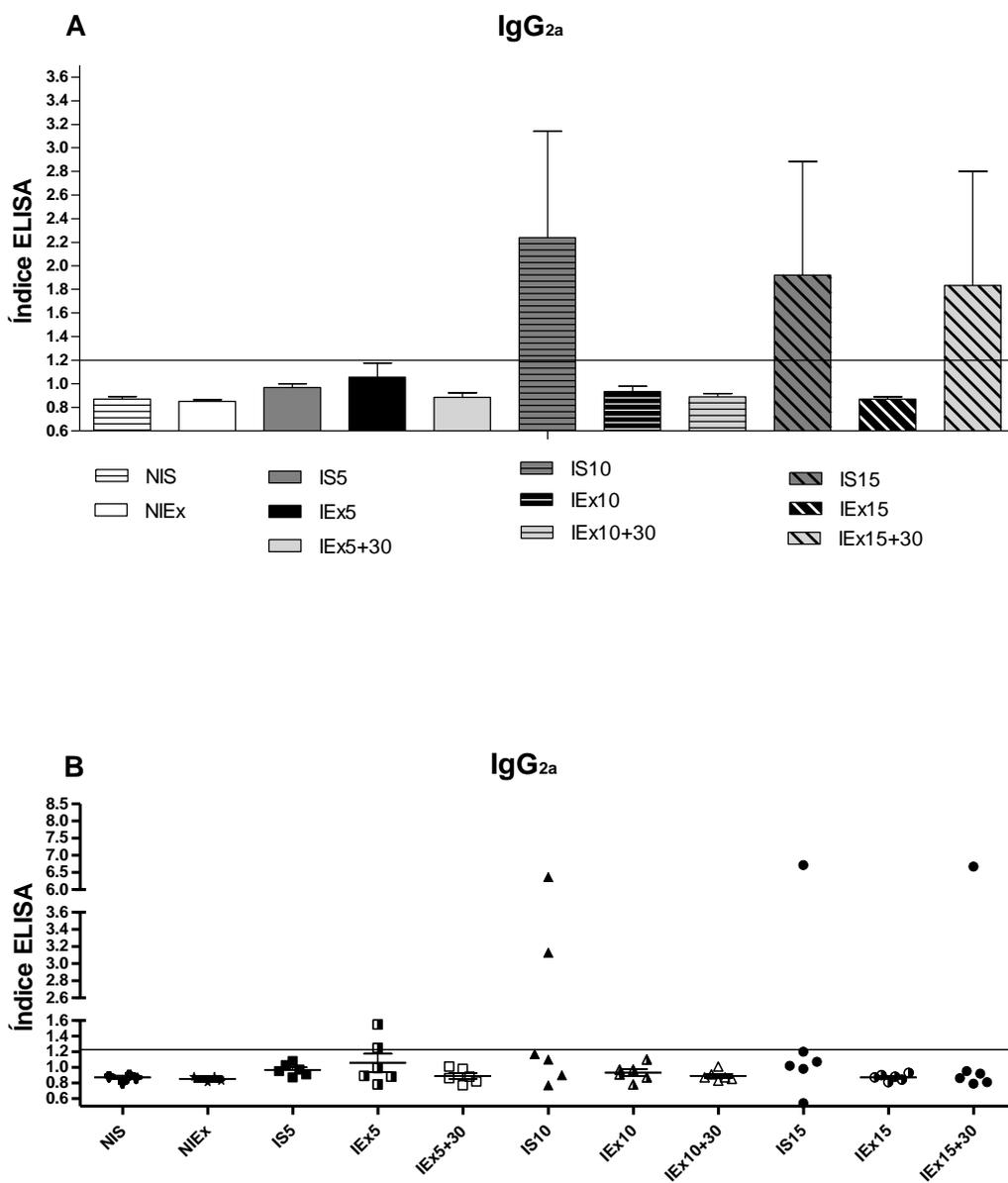
Experimento 8. Avaliações de força dos camundongos (C57BL6) exercitados: controle [Exercitado não infectado (NIS, n=4)] e os seis infectados [Exercitado (IEx5, IEx10 e IEx15, n=6 cada); Exercitado mais trinta dias (IEx5+30, IEx10+30 e IEx15+30, n=6 cada)]. Camundongos foram infectados com 12,5 semanas de idade com 5, 10 e 15 cistos. Dados expressos em média \pm SEM. Durante todo o experimento foram realizada 9 avaliações, sendo a 5ª logo antes da infecção e a última (9ª) na semana da eutanásia. Em todos os grupos houve ganho de força expressivo entre a primeira avaliação e a nona (**P<0.0001). Dados expressos em média \pm SEM.

Em relação à avaliação de 1RM (Figura 39 e Figura 40) pode-se identificar ganho de força aos animais com o passar do tempo.

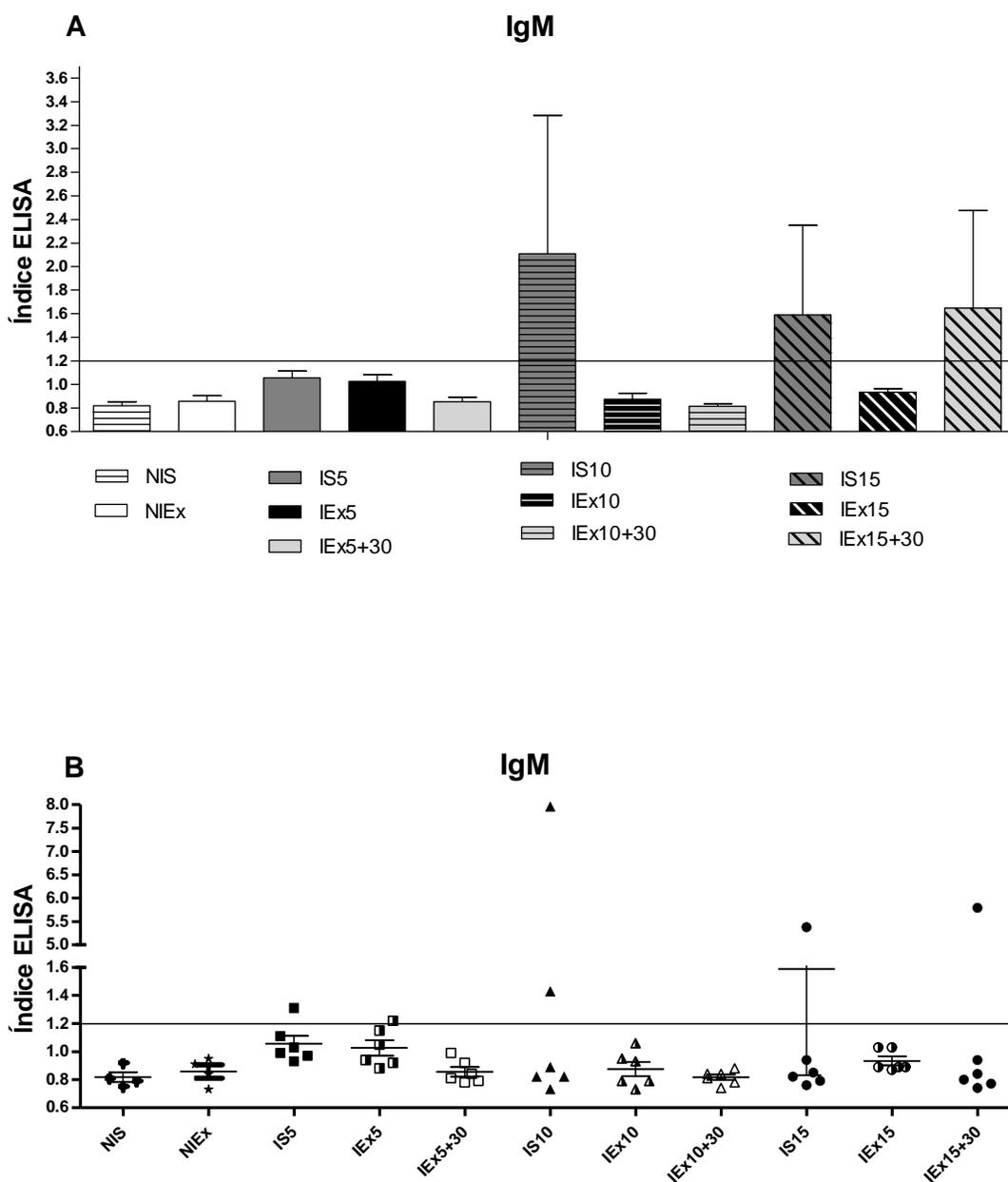
Figura 41 - Índice ELISA de Imunoglobulina-G total anti-*T. gondii* para o experimento 8



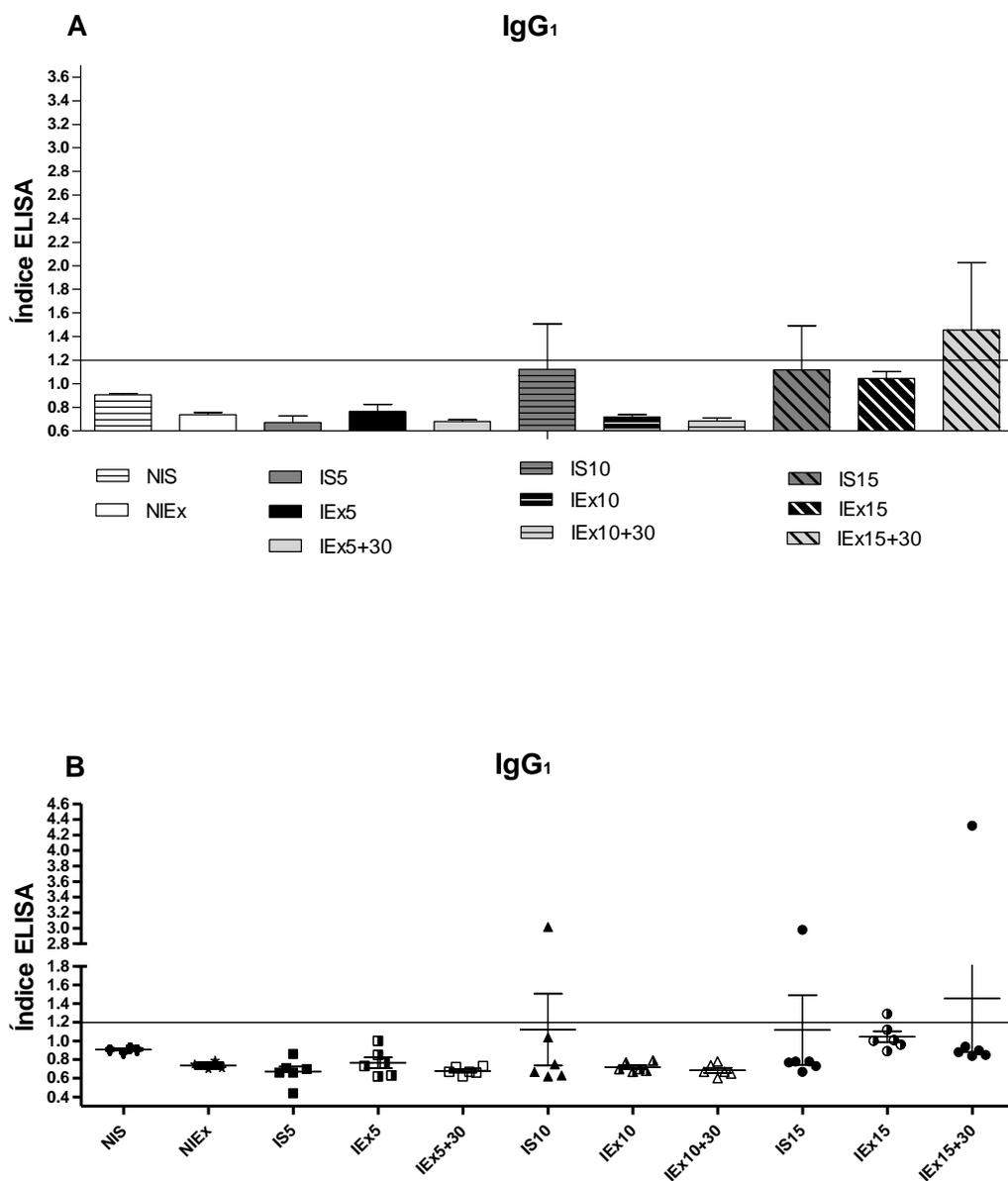
Experimento 8. Teste de soroconversão (ELISA) 30 dias após a infecção - IgG_{total}. Grupos: 02 controle [Sedentário não Infectado (NIS, n=4); Exercitado não infectado (NIS, n=4)] e os nove infectados [Sedentário (IS5, IS10 e IS15, n=6 cada), Exercitado (IEx5, IEx10 e IEx15, n=6 cada); Exercitado mais trinta dias (IEx5+30, IEx10+30 e IEx15+30, n=6 cada)]; O *Cutoff* foi considerado ser 1,2 (Índice ELISA). Não houve diferença significativa para nenhum grupo ($P>0,05$). Dados são expressos em média \pm SEM.

Figura 42 - Índice ELISA de Imunoglobulina-G_{2a} anti-*T. gondii* para o experimento 8

Experimento 8. Teste de soroconversão (ELISA) 30 dias após a infecção - IgG_{2a}. Grupos: 02 controle [Sedentário não Infectado (NIS, n=4); Exercitado não infectado (NIS, n=4)] e os nove infectados [Sedentário (IS5, IS10 e IS15, n=6 cada), Exercitado (IEx5, IEx10 e IEx15, n=6 cada); Exercitado mais trinta dias (IEx5+30, IEx10+30 e IEx15+30, n=6 cada)]; O *Cutoff* foi considerado ser 1,2 (Índice ELISA). Não houve diferença significativa para nenhum grupo ($P>0,05$). Dados são expressos em média \pm SEM.

Figura 43 - Índice ELISA de Imunoglobulina-M anti-*T. gondii* para o experimento 8

Experimento 8. Teste de soroconversão (ELISA) 30 dias após a infecção - IgM. Grupos: 02 controle [Sedentário não Infectado (NIS, n=4); Exercitado não infectado (NIS, n=4)] e os nove infectados [Sedentário (IS5, IS10 e IS15, n=6 cada), Exercitado (IEx5, IEx10 e IEx15, n=6 cada); Exercitado mais trinta dias (IEx5+30, IEx10+30 e IEx15+30, n=6 cada)]; O *Cutoff* foi considerado ser 1,2 (Índice ELISA). Não houve diferença significativa para nenhum grupo ($P>0,05$). Dados são expressos em média \pm SEM.

Figura 44 - Índice ELISA de Imunoglobulina-G₁ anti-*T. gondii* para o experimento 8

Experimento 8. Teste de soroconversão (ELISA) 30 dias após a infecção - IgG₁. Grupos: 02 controle [Sedentário não Infectado (NIS, n=4); Exercitado não infectado (NIS, n=4)] e os nove infectados [Sedentário (IS5, IS10 e IS15, n=6 cada), Exercitado (IEx5, IEx10 e IEx15, n=6 cada); Exercitado mais trinta dias (IEx5+30, IEx10+30 e IEx15+30, n=6 cada)]; O *Cutoff* foi considerado ser 1,2 (Índice ELISA). Não houve diferença significativa para nenhum grupo ($P > 0,05$). Dados são expressos em média \pm SEM.

No que se refere a soroconversão (Figura 41 e Figura 44), assim como no experimento 6 (Figura 32), os animais não tiveram unanimidade na soroconversão clássica de pelo menos IgG_{total} e IgG_{2a} (Figura 41 e Figura 44, Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação da quantidade de animais soroconvertidos para diferentes imunoglobulinas (IgG_{total}, IgG_{2A}, IgM e IgG₁) para os experimentos 6 e 8

Experimentos		6			8								
Igs	Cistos	5			5			10			15		
		S	E1	E2	S	E1	E2	S	E1	E2	S	E1	E2
		0	0	3	0	0	1	2	0	0	2	2	1
		0	2	3	0	2	0	2	0	0	2	0	1
		1	1	1	1	1	0	2	0	0	1	0	1
		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1

Todos os animais dos grupos relacionados acima foram infectados com *T. gondii*, mas houve pouca taxa de soroconverção. Grupos: **S**, Sedentário Infectados (IS); **E1**, Exercitado Infectado (IEx); **E2** (Exercitado Infectado que continuou treinando por mais 30 dias).

4.8 Experimentos finais: resultados

Os resultados aqui apresentados são de conjuntos de experimentos chaves considerados elementos fundamentais ao experimento geral.

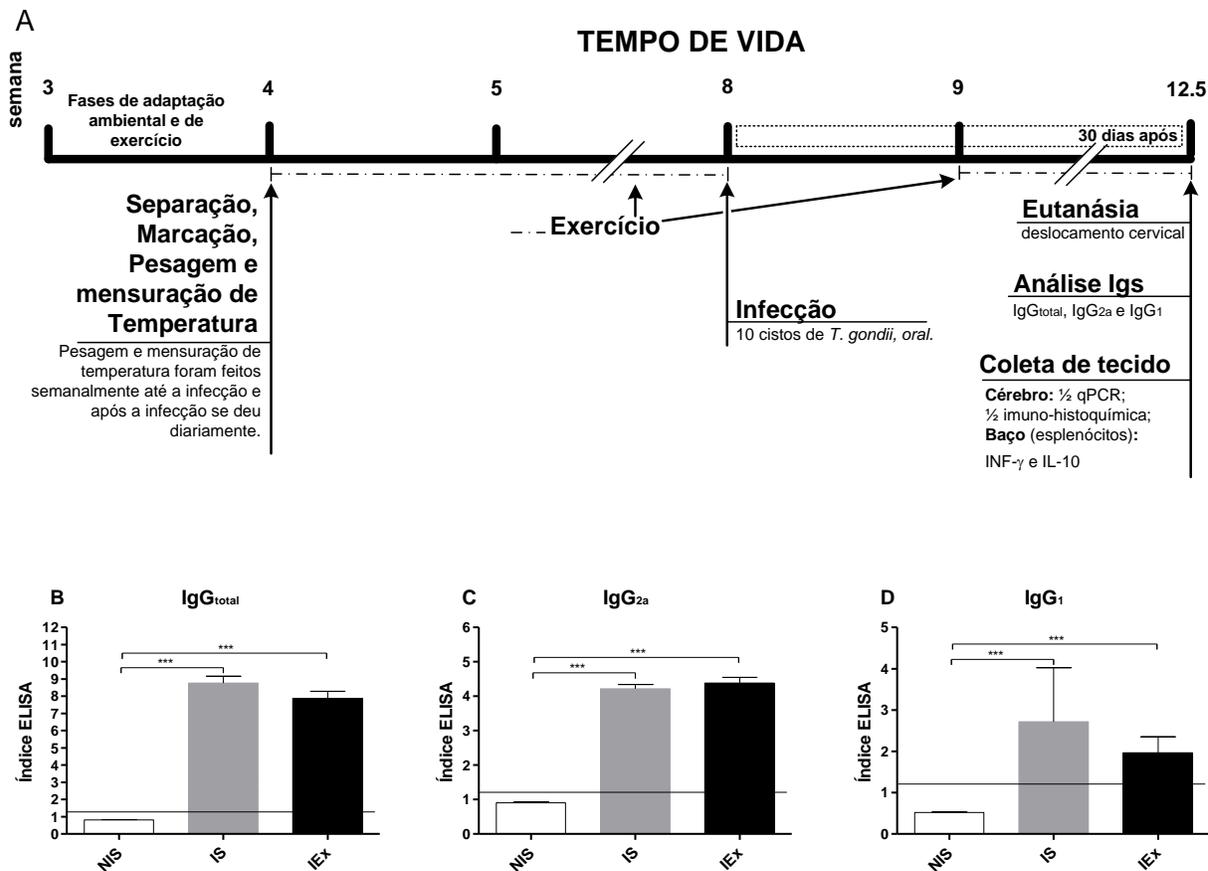
Para o primeiro conjunto de experimentos os camundongos foram infectados quatro semanas após o início do programa de treinamento de exercícios (corrida e resistido). Este experimento apresentou os mesmos objetivos dos experimentos 02, 06 e 08.

Para o segundo conjunto de experimentos os camundongos foram infectados antes do início do programa de treinamento de exercícios (corrida e resistido) e foram acompanhados para realização de uma curva de sobrevivência.

4.8.1 Primeiro conjunto de experimentos

Todas as análises foram realizadas em animais soroconvertidos para *T. gondii* (Figura 45 B-D; e Figura 49 B-E, exceto IgM para o primeiro conjunto de experimentos). Exceto para dois camundongos do grupo IS e um do grupo IEx que foram retirados do experimento, por não apresentaram soroconversão (ELISA) para *T. gondii* e nem carga parasitária (qPCR ou Imunohistoquímica). Além disso, um camundongo do grupo IEx não teve seus tecidos analisados, pois veio a óbito dois dias antes da eutanásia (Figura 45 A).

Figura 45 - Primeiro conjunto de experimentos: desenho esquemático do experimento e soroconversão.



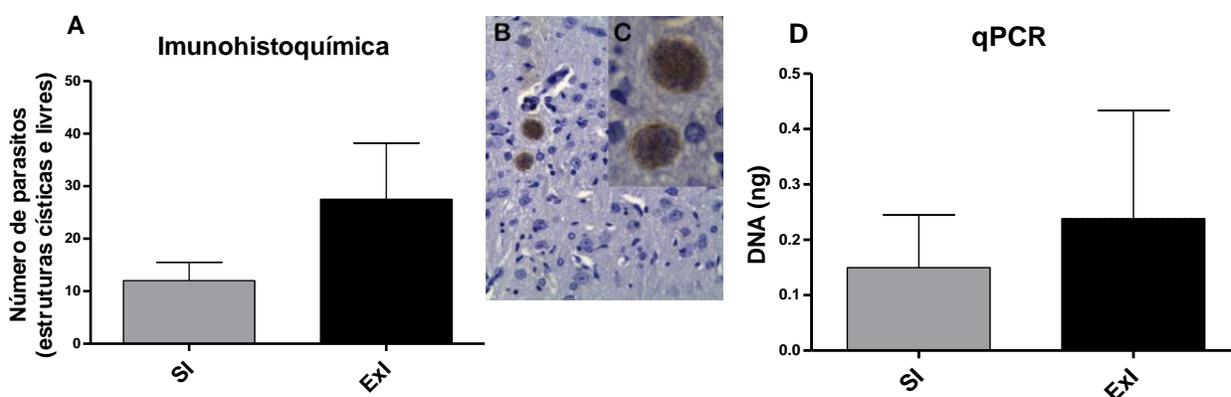
Primeiro conjunto de experimentos: (A) Esquema ao longo do tempo; (B, C e D) Teste (ELISA) de soroconversão 30 dias após a infecção. Todos os grupos foram testados previamente à infecção. Grupos: um grupo controle sedentário não infectado (NIS=4), dois grupos infectados [sedentário (IS, n=4) e um exercitado (IEx, n=4)]. O *Cutoff* foi considerado ser 1.2 (índice ELISA). Dados expressos em média \pm SEM. ***P<0.001.

Todos os animais utilizados nas análises tiveram suas soroconversões para o *T. gondii* confirmadas (Figura 45 B). Neste experimento não foi avaliado IgM.

Neste primeiro conjunto de experimento foram realizadas as análises de carga parasitária por dois métodos, imunohistoquímica (Figura 46 A-C) e qPCR (Figura 46 D). Nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi encontrada entre os grupos IS e IEx para ambos os métodos de análises.

Um animal do grupo IS mostrou uma carga parasitária muito baixa para a quantificação de DNA genômico de *T. gondii* (3x menos comparado com a segunda amostra de menor valor). Resultado evidenciado na imunohistoquímica que apresentou o menor valor de todos os resultados (50% menos comparada com a média do grupo) para contagem cerebral de cistos e parasitos livres.

Figura 46 - Primeiro conjunto de experimentos: avaliação da carga parasitária



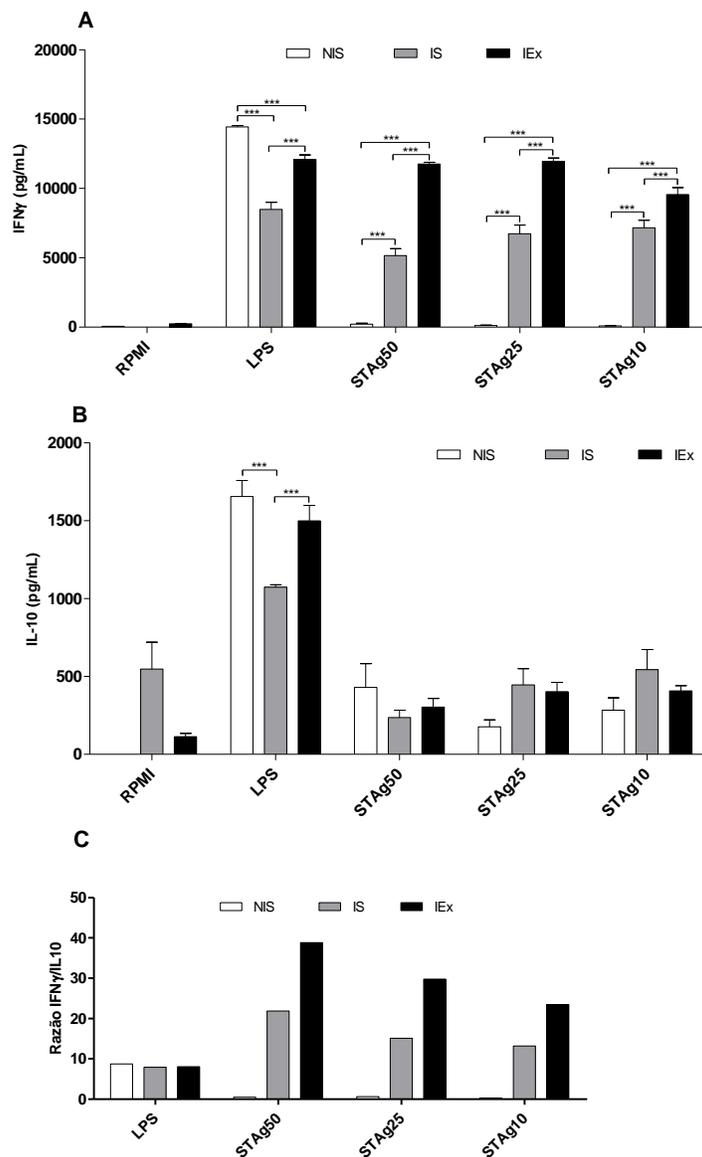
Primeiro conjunto de experimentos: (A) Total de parasitos por hemisfério cerebral. O número de cistos detectados por imunohistoquímica no cérebro (metade do cérebro) de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* em dois grupos: grupos sedentário infectados (IS, $n=4$) e grupo exercitado infectado (IEx, $n=4$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada $P>0,05$. Todos os valores foram anotados por dois inspetores diferentes. (B e C) Imagens de 40 x e 100 x de aumento respectivamente. (D) - Quantificação de DNA (ng) de *T. gondii* de grupos sedentários infectados (IS, $n=4$) e grupos infectados exercitados (IEx, $n=4$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada $P>0,05$. Dados expressos em média \pm SEM.

A produção de IFN- γ e IL-10 (Figura 47 A e B) de esplenócitos dos três grupos de camundongos (NIS, IS e IEx; Figura 45 A) do primeiro conjunto de experimentos, mostrou que para IL-10 houve diferença estatísticas ($P<0,001$) somente para o LPS (grupos NIS x IS e IEx x IS). Já para o IFN- γ houve diferenças estatísticas ($P<0,001$)

entre todos os estímulos e grupos, exceto para o estímulo controle negativo (RPMI). Para o LPS (controle positivo da reação), o grupo controle (NIS) mostrou alta produção

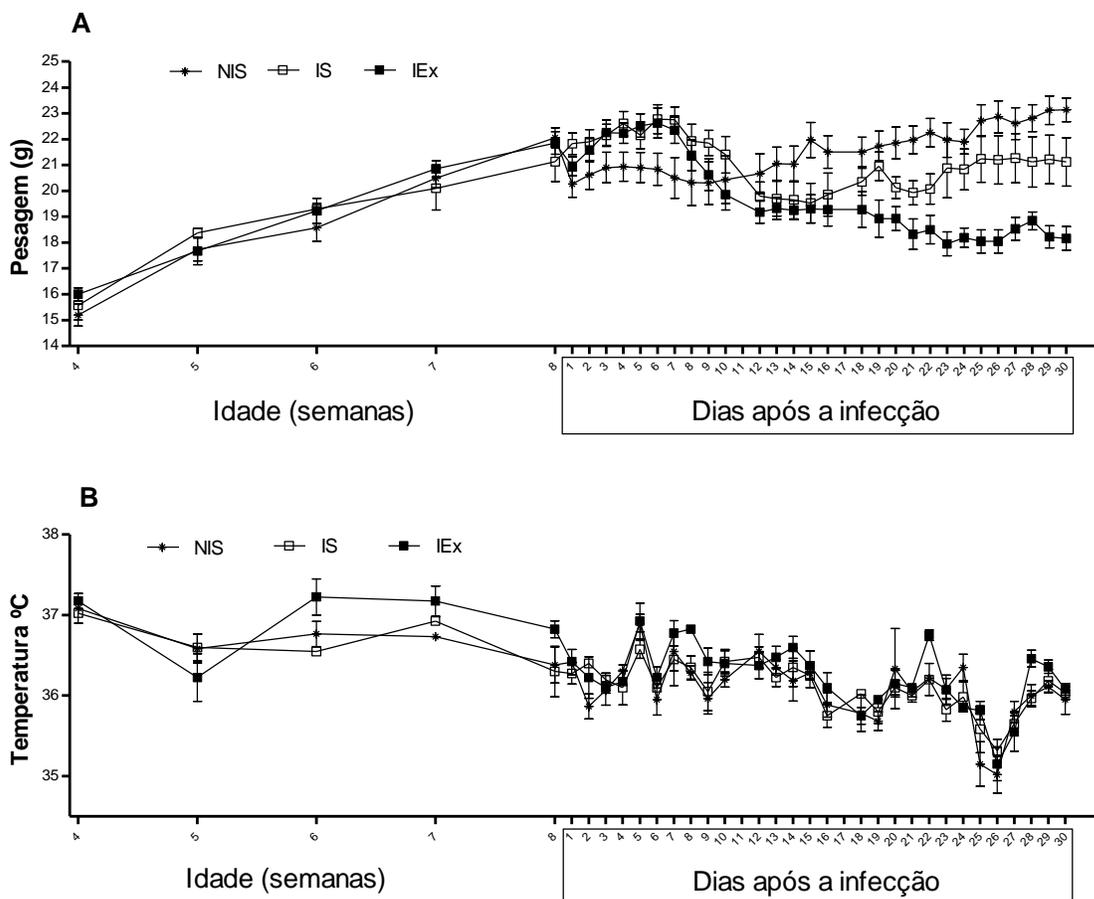
Figura 47 - Primeiro conjunto de experimentos: Estímulos *in vitro* de esplenócitos e perfil de IFN- γ e IL-10 e sua razão de IFN- γ , seguido pelo grupo IEx e em seguida o IS. Para as diferentes concentrações de STAg (50, 25 e 10 $\mu\text{g/ml}$) o grupo IEx teve a maior produção de IFN- γ , sendo que o grupo controle (NIS), como esperado, mostrou produção irrisória de IFN- γ . Uma vez que não houve diferença para a STAg de IL-10, a razão entre IFN- γ /IL-10 (Figura 47 C) mostrou-se maior para o grupo IEx quando estimulado por STAg.

As mensurações de peso e de temperatura (Figura 48 - A e B) dos animais do primeiro conjunto de experimentos não mostraram diferenças significativas ($P>0.05$) até a infecção. Após o procedimento de infecção para o peso foram identificadas diferenças entre o controle (NIS) comparado com os grupos infectados (IS e IEx), e a partir do dia 23 após a infecção também foram encontradas diferenças ($P<0.05$) entre os grupos infectados, tendo a menor média o grupo IEx (Figura 48 A). Mesmo após a infecção, não foram encontradas diferenças significantes ($P>0,05$) para a mensuração de temperatura.



Primeiro conjunto de experimentos. Produção de IFN- γ e IL-10 por esplenócitos de três grupos de camundongos. Esplenócitos de três grupos [grupo controles, sedentário não infectado (NIS, n=4) grupo sedentário infectado (IS, n=4) e grupo exercitado infectado (n=4)] foram testados com vários estímulos: lipopolysacarídeo bacteriano (LPS; 1 μ g/ml), antígeno solúvel de taquizoíta de *T. gondii* (STAg; em três dosagens 50, 25 e 10 μ g/ml). Valores estão indicados como média \pm SEM. ***P<0.0001. (C) A razão de IFN- γ /IL-10 dos estímulos é também mostrado (Os esplenócitos foram pegados de um *pool* de animais).

Figura 48 - Primeiro conjunto de experimentos: mensuração de peso e temperatura de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo

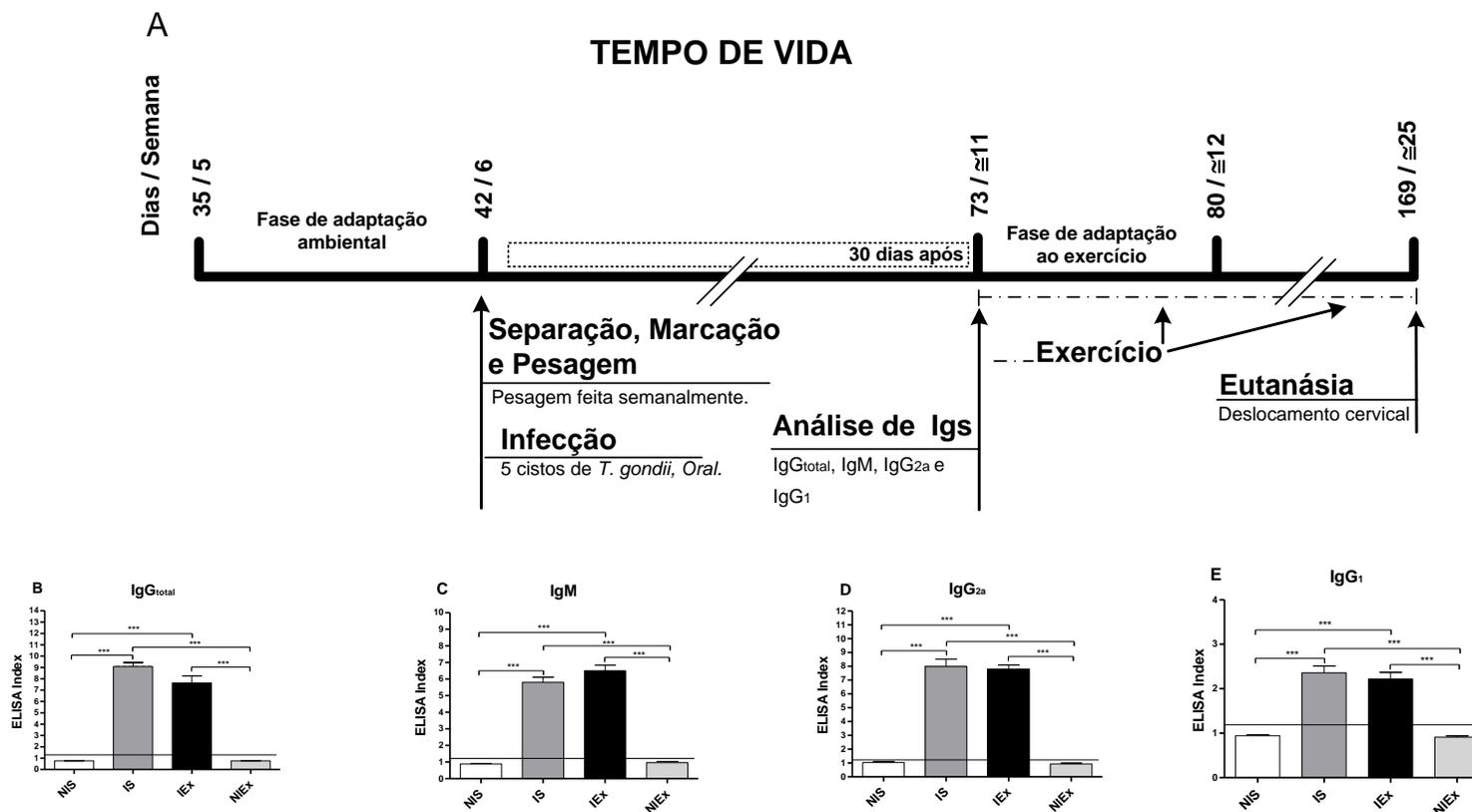


Primeiro conjunto de experimentos. Ambas mensurações foram realizadas com três grupos [grupo controles, sedentário não infectado (NIS, n=4) grupo sedentário infectado (IS, n=4) e grupo exercitado infectado (n=4)]. (A) No que tange ao peso, não houve diferença significativa ($P>0,05$) até a infecção. Após esta, houve diferenças estatísticas entre os grupos controle e infectados, e após o dia 23 (após infecção) houve diferenças entre os grupos infectados também ($P<0,05$). (B) Não houve diferenças significativa no que diz respeito à mensuração da temperatura ($P>0,05$). Camundongos foram infectados com 8 semanas de idade com 10 cystos. Dados expressos em média \pm SEM.

4.8.2 Segundo conjunto de experimentos

Para este segundo conjunto de experimentos (Figura 49) a infecção (5 cystos) ocorreu antes do início do treinamento físico.

Figura 49 - Segundo conjunto de experimentos: desenho esquemático do experimento e soroconversão

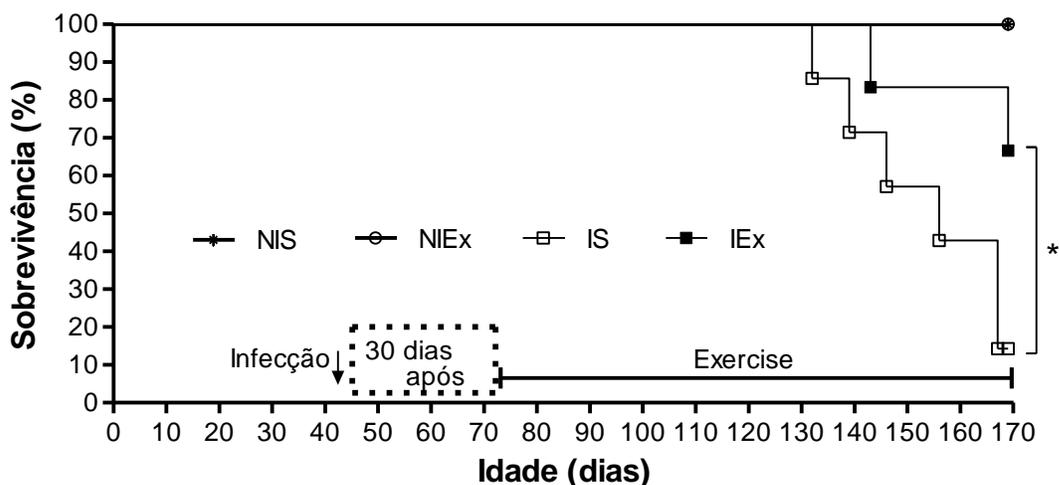


Segundo conjunto de experimentos. (A) Desenho esquemático ao longo da vida. (B-E) Teste (ELISA) de soroconversão 30 dias após a infecção (5 cistos). Total de quatro grupos: dois grupos controles [(Sedentário (NIS, n=6) e Exercitado (NIEEx, n=60)] e dois grupos infectados [Sedentários (IS, n=7) e Exercitado (n=6)]. O *Cutoff* foi considerado ser 1.2 (índice ELISA). Dados expressos em média \pm SEM. ***P<0.001.

No que diz respeito às taxas de sobrevivência (Figura 50) dos animais deste segundo conjunto de experimentos, foi encontrada uma diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos infectados (IEx e IS).

O grupo exercitado (IEx) teve uma média de vida mais longa que o grupo sedentário (IS). O primeiro animal do grupo sedentário morreu 60 dias após a infecção (dia 132), e antes do primeiro animal do grupo exercitado morrer (dia 143), outro animal do grupo sedentário morreu 67 após (dia 139). O segundo animal exercitado morreu no dia 169, mas antes dele quatro outros animais do grupo sedentário haviam morrido (dias 146, 156, 167 e 167, respectivamente). No dia 169 havia somente um camundongo do grupo sedentário, ou seja, este conjunto de experimentos atingiu o objetivo e os camundongos foram eutanasiados.

Figura 50 – Segundo conjunto de experimento: curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 exercitados versus sedentários, infectados e não infectados



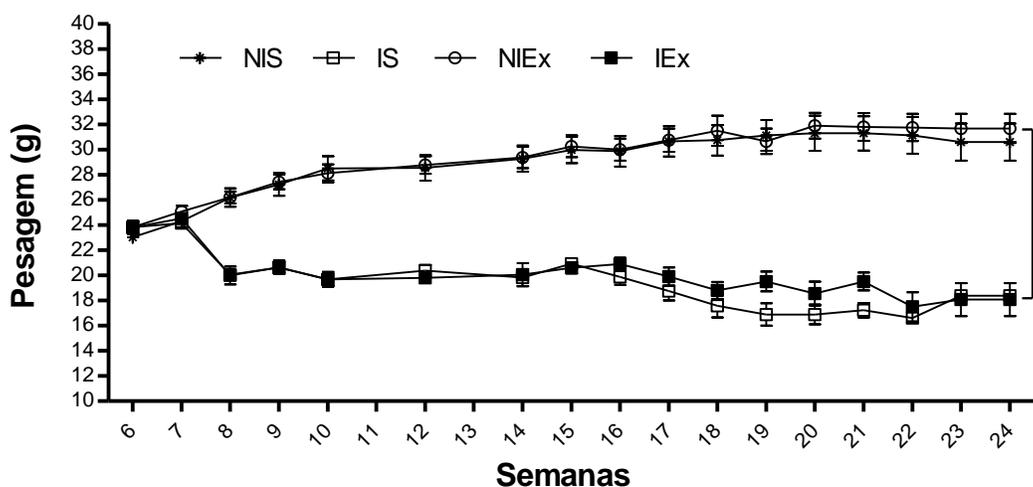
Segundo conjunto de experimentos. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com 6 semanas de idade com 5 cistos de *T. gondii*. Total de quatro grupos: dois grupos controles [(sedentário (NIS, n=6) e exercitado (NIEEx, n=6)] e dois grupos infectados [sedentários (IS, n=7) e exercitado (n=6)]. Os animais infectados exercitados sobreviveram mais tempo que os sedentários (* $p < 0.05$, Kaplan-Meier com Log-rank test).

O único camundongo sedentário que finalizou o experimento apresentou sinais de recuperação, uma vez que estava com 16,6 g e ao final estava com 18,4 g, peso muito semelhante ao de quatro semanas anteriores (18,9 g, 12^a semana; Figura 50).

Entre os quatro animais exercitados infectados, dois estavam pesando por volta de 16g e um estava acima de 17g. O quarto camundongo alcançou 19,4 g (3^a semana após a infecção ou 9^a semana Figura 51) e apresentou variações durante o experimento, mas ao final ele apresentou peso estável (± 22 g). Estes dois últimos camundongos realizaram tanto a corrida como o exercício resistido regularmente. Os outros não puderam correr ou realizar exercícios resistidos de forma completa pelo menos 10 dias antes da morte.

Foram encontradas diferenças significantes de peso (Figura 51, $P < 0,05$) entre os grupos infectados (IEx e IS) comparados com os controles (NIEx e NIS), mas não foram encontradas diferenças intragrupos (IEx x IS ou IEx x IS, $P > 0,05$).

Figura 51 - Segundo conjunto de experimento: peso dos camundongos C57BL/6 ao longo do tempo

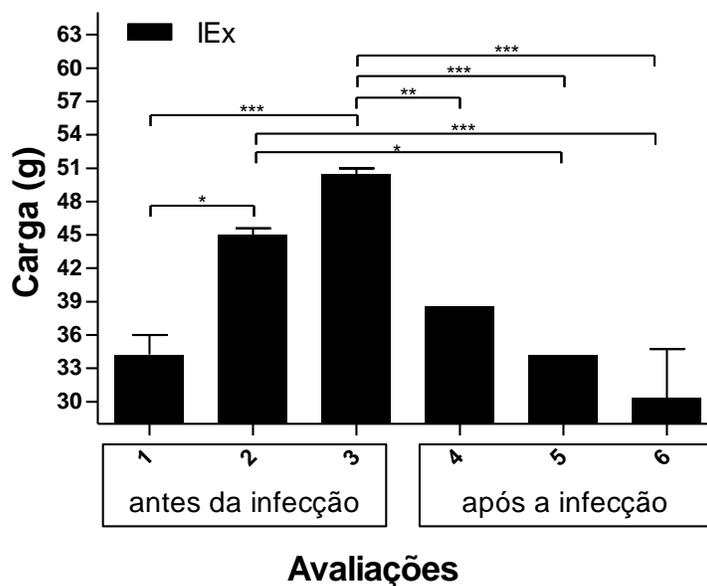


Segundo conjunto de experimentos. Pesagem realizada a partir da 6^a (tempo antes da infecção) semana até o final. Diferenças ($*P < 0,05$) foram encontradas entre os grupos infectados [IEx, (n=6) x IS, (n=7)] e não infectados [NIEx, (n=6) x NIS, (n=6)], mas não houve diferenças entre os grupos de mesmo tratamento de infecção ($P > 0,05$). Dados expressos em média \pm SEM.

4.9 Resultados das avaliações de 1-RM dos dois conjuntos de experimentos

O teste de uma repetição máxima (1-RM) foi realizado em ambos os conjuntos de experimentos (Figura 52 e Figura 53). Na avaliação de força do primeiro conjunto de experimentos (Figura 52) existe um aumento significativo até a infecção e depois desta há uma queda expressiva na produção de força máxima (**P<0,01 para n^o3 x n^o4*** e P<0,0001).

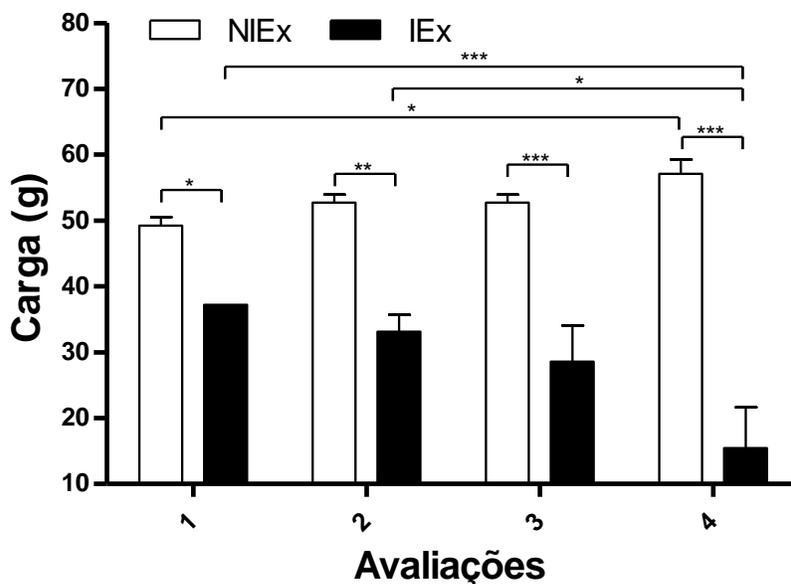
Figura 52 - Segundo conjunto de experimentos: avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo



Primeiro conjunto de experimentos. Avaliação de força utilizando uma repetição máxima (1 RM) do grupo infectado exercitado (IEx, n=4). A avaliação n^o 3 (dois dias antes da infecção) foi estatisticamente diferente (**P<0,0001; n^o 3 x n^o4, **P<0,01) das avaliações, exceto para o n.º 2. Camundongos foram infectados com 8 semanas de idade com 10 cistos. Outras diferenças foram também mostrados no gráfico (*P<0.05 and **P<0.01).

Já para o segundo conjunto de experimentos, uma vez que a infecção foi realizada antes do início do exercício, os grupos já eram diferentes (Figura 53) no início (*P<0,05) e acentuaram significativamente esta diferença com o passar do tempo (**P<0,0001).

Figura 53 - Segundo conjunto de experimentos: avaliação de força de camundongos C57BL/6 ao longo do tempo



Segundo conjunto de experimentos. Avaliação de força utilizando uma repetição máxima (1 RM) de camundongos do grupo controle (NIEx, n=6) e do grupo infectado (IEx, n=6). Em todos os pontos o grupo NIEx teve médias maiores comparada com IEx (* $P < 0,05$ para 1; ** $P < 0,01$ para 2; *** $P < 0,0001$ para 3 e 4). Diferenças estatísticas intragrupo (NIEx) entre a avaliação nº1 e 4 foram encontradas (* $P < 0,05$). Foi encontrado também diferenças estatísticas entre a quarta avaliação do grupo IEx comparado com o primeira (** $P < 0,0001$) e a segunda (** $P < 0,01$) avaliação do mesmo grupo.

5 DISCUSSÃO

Exercício físico regular moderado tornou-se um fator muito importante no que diz respeito à qualidade de vida para as pessoas nos séculos 20 e 21. A (WHO, 2010) listou suas recomendações de exercícios físicos para todas as faixas etárias, sendo os exercícios aeróbicos e resistidos recomendados para todos adultos acima de 18 anos de idade. Dentre todas as adaptações a mais importante que a atividade física nos proporciona é os benefícios imunológicos (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b) portanto o estudo da imunologia do exercício tem se tornado essencial (SHEPHARD, 2010; BORTOLINI et al., 2013).

Muitos estudos objetivaram verificar a influência do exercício físico no sistema imunológico (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b). Alguns deles pesquisaram exercícios físicos aeróbicos versus parasitos (CHAO et al., 1992; SCHEBELESKI-SOARES et al., 2009; TERRA et al., 2013; MOREIRA et al., 2014), mas até o momento, nenhum estudo pesquisou a infecção por *T. gondii* versus o treinamento de exercícios físicos resistidos e aeróbicos juntos. Apesar deste parasito ser o mais ubiqüitário do mundo e estes dois tipos de exercícios recomendados por importantes instituições para se alcançar uma boa qualidade de vida.

Em relação ao experimento 1 (item 4.2) pode-se ponderar que a infecção com 10 cistos para os camundongos da linhagem BALB/C foi insuficiente para causar infecção aparente, uma vez que foram encontradas quantidades baixas (menores que 50 cistos/mL, de macerado de cérebro de cinco camundongos, próximo a uma concentração de 0 em 20 μ L de suspensão) de cistos nos grupos infectados. Assim como, após testar o treinamento aeróbico contínuo, ao início do experimento, e intervalado foi possível identificar a necessidade de serem utilizados para auxiliar na prevenção de treinos exaustivos. O intervalo foi de um minuto ao final do experimento. Além disso, apesar dos camundongos BALB/c terem alcançado uma velocidade final maior que os C57BL/6, eles não terminavam os exercício exaustos como os C57BL/6, dado que corrobora com os de Lerman e colaboradores (2002).

Com os achados neste experimento inicial, pode-se inferir que em experimentos futuros as velocidades empregadas na esteira para os camundongos BALB/c devam ser maiores.

Em relação ao experimento 2, primeiro a testar a susceptibilidade de camundongos previamente treinados ao *T. gondii*, pode-se inferir que os camundongos BALB/c desenvolvem com maior facilidade tanto os exercícios aeróbicos quanto os resistidos quando comparados aos C57BL/6. Este achado pode estar relacionado à severidade da infecção, uma vez que, as quantidades de cistos foram menores para os BALB/c, menos susceptíveis, quando comparados aos C57BL/6, mais susceptíveis, (Figura 27). Outros dados pertinentes referem-se às baixas quantidade de cistos cerebrais encontrados nos camundongos BALB/c, mesmo após uma infecção com quatro vezes mais cistos (40 cistos) que a quantidade de cistos utilizadas para infectar os C57BL/6 (10 cistos). Com este achado, a quantidade de cistos para esta linhagem (BALB/c) correspondente aos 10 cistos utilizados para infecção dos C57BL/6 foi posteriormente investigado (Experimento 3). Esta investigação mostrou que a quantidade próxima ao correspondente, foi de 75 cistos (Figura 30).

Além disso, este experimento sugere que a quantidade de cistos seja dose dependente, uma vez que com o aumento de cistos na infecção (50, 75 e 100 cistos) houve maior carga parasitária cerebral encontrada (Figura 30). Estes achados estão em concordância com Terrazas et al. (2010) que compararam a infecção feita com 40 cistos à realizada com 100 cistos de *T. gondii* também com a cepa ME49 utilizando-se camundongos BALB/c. Esses autores concluíram que 100 cistos poderiam gerar uma infecção severa e levar os BALB/c a sucumbirem mais.

No experimento 2 quantidades menores de cistos (cinco cistos) foram utilizadas com o intuito de diminuir a velocidade da evolução da severidade da doença e assim, prolongar a vida dos animais para que fosse possível verificar a sobrevivência ao longo do tempo de animais sedentários e exercitados. Outro dado relevante do experimento 2 foi o achado de que com a infecção houve redução de peso (Figura 25) para ambos os grupos (IEx e IS) dos C57BL/6 infectados, no entanto, para os BALB/c, o grupo infectado exercitado (IEx, n=4) teve o menor peso entre os grupos e diferente do

resultado dos C57BL/6, não encontrando-se diferenças significantes ($P>0,05$) entre os grupos controle e sedentário infectados.

Concomitante a aferição do peso, foi encontrada diminuição expressiva da carga máxima (Figura 25) para os C57BL/6. Não foi verificada esta queda de rendimento para os camundongos BALB/c. Possivelmente porque estes camundongos foram infectados proporcionalmente com menos cistos que os C57BL/6. Esta diferença de resultados entre os pesos dos C57BL/6 e BALB/c aliado aos resultados da diminuição de rendimento dos C57BL/6, mas não aos dos BALB/c, justificam a realização dos experimentos 6 e 8 com os camundongos C57BL/6, que tiveram diferentes quantidades de cistos testadas frente ao treinamento prévio. Além disso, especula-se que a quantidade de cistos esteja ligada ao menor rendimento durante o exercício dos C57BL/6. Sugere-se que futuros experimentos utilizem camundongos BALB/c e os infectem com diferentes quantidades de cistos, principalmente proporcionais aos 10 cistos utilizados para infectar os C57BL/6.

Em relação ao experimento 6 (Figura 32) não foi encontrado, entre os grupos, diferenças estatísticas significantes nem para o peso (

Figura 33) e nem para as avaliações de 1 RM (Figura 34). Estes dados de 1RM confirmaram mais uma vez que animais C57BL/6 têm ganhos expressivos de força com o treinamento. Estes dados aliados ao de que todos os animais tiveram carga parasitária por qPCR, sugere que a quantidade de cistos utilizadas (cinco cistos) para os C57BL/6 possa ser correspondente com a quantidade cistos (40 cistos) para os BALB/c do experimento 2 (Figura 27). No entanto, como os métodos de quantificação são diferentes, futuros experimentos devem ser realizados para confirmarem esta possibilidade.

Em relação à soroconversão dos animais nos experimentos desenhados para avaliar a susceptibilidade ao *T. gondii* dos C57BL/6 infectados com cinco ou mais cistos, pode-se observar que as taxas de positividade foram baixas (Tabela 1). Dados de qPCR (item 4.6) deste primeiro experimento citado sobre a susceptibilidade ao *T. gondii* de C57BL/6, demonstraram que todos os animais foram infectados (Figura 36). Desta forma especula-se que talvez a quantidade de cistos em idades maiores que a

de seis a oito semanas deva ter também uma relação de dose-dependência com a taxa de soroconversão. A este respeito, Bach e colaboradores (2013) comprovaram que exercícios regulares prévios agiram como adjuvantes na produção de anticorpos específicos por seres humanos que haviam sido vacinados. Uma outra explicação, poderia ser o método (ELISA) utilizado para realizar identificação das imunoglobulinas como já foi inferido por outros trabalhos (SNAPPER; PAUL, 1987; BONENFANT et al., 2001). O método de ELISA demonstrou uma excelente correlação de 100% com o de qPCR (e.g.: primeiro experimento principal de conjunto de experimentos). Embora haja evidências da maior sensibilidade do qPCR comparado com o método de ELISA na fase (NGUYEN et al., 1996; HAFID et al., 2001) não se tem evidências em modelos animais da discordância entre os dois métodos (qPCR e ELISA) no que se refere a infecção crônica por *T. gondii* (NGUYEN et al., 1996).

Em relação aos achados dos conjuntos finais de experimentos as relações musculares e imunológicas relacionadas aos exercícios físicos são vitais. O músculo esquelético tem sido visto como um órgão endócrino que produz quantidades significantes de citocinas durante o exercício (aeróbico e/ou resistido) e.g.: IL-6 (STEENBERG et al., 2000). Dentre eles, IL-15 pode ser produzida pelo músculo *in vitro* (GRABSTEIN et al., 1994) e *in vivo*, em humanos logo após exercício resistido (NIELSEN et al., 2007), seguido por IL-7 (HAUGEN et al., 2010).

Sabe-se que a IL-7 desenvolve um importante papel no fornecimento de sinais para a sobrevivência de células naïve e T CD8⁺ de memória e sobre a IL-15 (MA; KOKA; BURKETT, 2006). Além disso, acredita-se que ela seja crucial para direcionar a proliferação basal das células T CD8⁺ de memória (MA et al., 2006). Bhadra e colaboradores (2010) encontraram que a IL-7 e IL-15 são extremamente importantes para o desenvolvimento da resposta imunológica protetora de células CD8⁺ T contra o *T. gondii*. Borger e colaboradores (1996) mostraram *in vitro* que, adicionando-se IL-7 em células T humanas a expressão de IFN- γ é regulada para cima de forma dose-dependente. Células T CD8⁺ T e IFN- γ são efetores essenciais na mediação da resistência para infecção aguda e crônica de *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992). Bhadra e colaboradores (2010) também sugeriram que seus

achados eram implicações importantes no entendimento do uso de IL-7 e IL-15 como adjuvantes para o regime de vacinação terapêutica contra patógenos intracelulares. E que as células T CD8⁺ constituem um componente essencial da imunidade protetora (BHADRA et al., (2010).

Recentemente estudos sobre o exercício físico regular tem comprovado ser este um adjuvante na vacinação em humanos (BACHI et al., 2013). Além disso, ele pode atenuar o processo de envelhecimento e prolongar o tempo de vida (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008).

Para Romeo e colaboradores (2010) enquanto o envelhecimento e hábitos sedentários podem potencializar o risco de infecção, através do aumento da imunodepressão, o exercício físico moderado e regular age combatendo a imunodepressão e diminuindo os riscos de infecção. Considerando estes dados, embora não tenham sido analisadas as concentrações de IL-7 e IL-15 ou as de células T CD8⁺, foram apresentados dados relevantes quanto a uma maior ativação de células esplenocíticas de animais exercitados versus sedentários (Figura 47 - A e B), através da maior produção de IFN- γ e uma inalteração dos níveis de IL-10, culminando em maiores razões de IFN- γ /IL-10. Além disso, mostrou-se também o aumento do tempo de vida (Figura 50) de camundongos infectados exercitados em comparação aos infectados sedentários, outro resultado muito sólido. Estes resultados podem estar relacionados não só com a manutenção da capacidade aeróbica dos camundongos, mas também com a manutenção ou aumento de força dos mesmos, uma vez que IL-7 (HAUGEN et al., 2010) e principalmente IL-15 (GRABSTEIN et al., 1994) são muito expressas pelo músculo esquelético em resposta a estímulos de força, e a produção de IFN- γ por esplenócitos é importante para a severidade da infecção por *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992). Para que seja possível conformar esta proposta, estudos futuros voltados exclusivamente ao exercício resistido poderão produzir resultados relevantes quanto ao grau de importância efetiva que este tipo de exercício apresenta na severidade da infecção de *T. gondii*, e assim, poderá ser possível indicar o exercício resistido como terapia para pessoas imunocomprometidas, como pacientes HIV/AIDS e *T. gondii* positivas.

No segundo conjunto de experimentos (Figura 49), uma vez que restou somente um camundongo sedentário vivo, não se realizou a quantificação de DNA genômico de *T. gondii* por qPCR. Possivelmente, em camundongos senis, poderia ser possível encontrar menos DNA no cérebro de *T. gondii* em animais exercitados comparados com os sedentários, mas para realizar estas análises com o número de animais necessários, a eutanásia deveria ter ocorrido imediatamente antes do início da morte dos camundongos (Figura 50) que ocorreram no 60º dia após a infecção.

No primeiro conjunto de experimentos, as análises imunohistoquímica (Figura 46 - A-C) e de qPCR (Figura 46 D) foram realizadas, mas nenhuma diferença ($p > 0.05$) foi encontrada entre os grupos IS e IEx para ambos os métodos de análise. Um camundongo sedentário deste conjunto mostrou uma carga parasitária de *T. gondii* (qPCR) muito pequena, mas em concordância com os resultados da análise por imunohistoquímica. Uma explicação de machos serem mais susceptibilidade a patógenos que demandam perfil Th1 para combatê-los pode estar relacionado ao fato que a testosterona leva os animais a um perfil Th2 (PINZAN et al., 2010). Assim, para estender o tempo de infecção no modelo de envelhecimento, como no segundo conjunto de experimentos, os camundongos C57BL/6 poderiam ter sido infectados com menos cistos (<5), ou se poderia ter utilizado camundongos menos susceptíveis ao *T. gondii*, como a linhagem BALB/c e/ou camundongos do gênero feminino. Desta forma, com a longevidade maior, seria possível alcançar resultados consistentes relacionados às diferenças das cargas parasitárias cerebrais entre animais exercitados e sedentários.

Ainda considerando nestes dois últimos conjuntos de experimentos (itens 4.8.1 e 4.8.2) o exercício de força se mostrou adequado, uma vez que houve aumento de força em ambos os conjuntos de experimentos. A avaliação da carga máxima (1 RM) do primeiro conjunto de experimentos (Figura 52) aponta que o grupo avaliado (IEx) obteve aumento ($P < 0,0001$) da força até a infecção (ocorrida logo após a avaliação de nº 3) alcançando mais de 2x sua média de massa corporal. No entanto, a massa corporal diminuiu dramaticamente ($P < 0,0001$) para o menor valor, após os camundongos serem infectados.

Os resultados sobre a avaliação de 1-RM (Figura 53) de ambos os grupos (IEx e NIEEx) do segundo conjunto de experimentos, mostrou uma diferença significativa estatisticamente inicial entre os grupos ($P < 0,01$) e esta diferença se tornou maior ($P < 0,0001$) após a terceira semana de avaliação. Esta diferença inicial indica que a infecção pode interferir no rendimento do exercício mesmo quando o exercício inicia-se na fase crônica da infecção por *T. gondii* (Figura 53). Em experimentos prévios utilizando duas linhagens de camundongos, C57BL/6 (e.g.: Figura 26 e Figura 40) e BALB/c (Figura 26) o aparato de escalada mostrou-se igualmente eficiente. É importante destacar que os BALB/c, após seis semanas de treinamento, tiveram um melhor rendimento que os C57BL/6 e chegaram a 1 RM de 400% de seus pesos corporais, enquanto que os C57BL/6 alcançaram 200%.

Em relação à pretensão de patentear o aparato de escalada, esta não foi possível, uma vez que uma patente de equipamento similar para ratos foi requerida por dois inventores chineses na Europa (TANG; WANG, 2011).

Quanto ao animal que morreu do primeiro conjunto de experimentos, a mortalidade de camundongos C57BL/6 após a infecção oral por *T. gondii* parece ser devido à necrose severa do intestino delgado, que foi mostrado ser dependente de linfócitos T CD4⁺ e mediado por IFN- γ (LIESENFELD et al., 1996). Além disso, a revisão de Walsh e colaboradores (2011a) discutiu que a atividade física de alguma forma pode aumentar a permeabilidade gastrointestinal, e que ela pode se tornar severa no exercício exaustivo. Chao e colegas (1992) encontraram em experimentos que a natação não é deletéria para camundongos na infecção aguda com a cepa Me49 de *T. gondii*. Por outro lado, como discutido anteriormente, no segundo conjunto de experimentos (Figura 50), em que os camundongos realizaram exercícios físicos somente 30 dias após a infecção e somente cinco cistos foram usados, ficou evidenciado que camundongos exercitados sobreviveram mais tempo ($P > 0,05$) quando comparados aos sedentários. Analisando-se, concomitantemente, estes dados pode-se inferir que o exercício físico tem potencial para gerar efeitos deletérios na fase aguda da infecção pelo *T. gondii*. Para melhor entender este assunto, trabalhos futuros que envolvam exercício físico em fase aguda da infecção por *T. gondii* devem ser

realizados, especialmente no que se refere à intensidade e tipo de exercício (resistido e/ou aeróbico).

Os dados sobre IFN- γ e IL-10 (Figura 47 A e B) claramente mostram que camundongos exercitados tiveram uma resposta Th1 mais significativa quando estimulados por STAg ($P < 0,001$), considerando-se uma maior produção de IFN- γ e uma inalteração na produção IL-10, culminando assim, em uma maior razão de IFN- γ /IL-10. Estes dados corroboram com Terra e colaboradores (2013) ao encontrarem que linfócitos e macrófagos de camundongos exercitados potencializaram sua eficiência através da maior produção de citocinas de perfil Th1 (e.g.: IFN- γ , IL-12 e TNF- α) quando estimulado, *in vitro*, por LPS, ConA e/ou *Leishmania major*. Este aumento do perfil Th1 para combater os parasitos intracelulares, em especial o *T. gondii* é crucial (GAZZINELLI et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992). Além disso, quando os esplenócitos do grupo IEx foram estimulados com LPS, suas respostas não foram tão expressivas. Resultados confirmados pelos de Terra e colaboradores (2013) em que o exercício físico prévio pode levar o hospedeiro a uma resposta de IFN- γ mais eficiente, e desta forma, proporcionar que estas células, quando fossem desafiados por um parasito intracelular como o *Toxoplasma gondii*, respondessem de maneira mais equilibrada aos perfis Th1/Th2.

Chao e colaboradores (1992) demonstraram que a implementação de um programa de natação diária atenuou significativamente a elevação dos níveis de TNF- α séricos causados pela infecção por *T. gondii*, esses autores foram os únicos que trabalharam com *T. gondii* e exercício físico até o presente. Neste mesmo experimento utilizaram camundongos fêmeas BALB/c e como rota de infecção a via intraperitoneal (IP).

Alguns modelos animais têm sido estudados extensivamente nas últimas duas décadas, e a linhagem C57BL/6 tem se mostrado a mais promissora, com várias vantagens, tais como, sua ampla disponibilidade, mudanças genéticas e várias linhagens mutantes (BALLAK et al., 2014). Para o modelo de infecção com *T. gondii*, a linhagem C57BL/6 é a mais estudada devido a sua alta susceptibilidade a este parasito (MCLEOD et al., 1984). Henry e Beverley (1976) foram os primeiros a demonstrarem

haver diferenças na susceptibilidade entre os gêneros, sendo as fêmeas menos susceptíveis ao *T. gondii* que os machos. O aumento da susceptibilidade dos hospedeiros ao protozoário tem sido descrito (ROBERTS; WALKER; ALEXANDER, 2001) e esta maior susceptibilidade de machos, pode estar relacionado ao fato da testosterona levar os animais a um perfil Th2 (PINZAN et al., 2010).

Sobre a rota de infecção, Meyer e colaboradores (2013) discutiram que através da via IP pode-se garantir a infecção, e ela pode ser realizada de maneira mais rápida quando comparada a infecção via oral. No entanto, discutiram ainda que a via IP pode ser mais severa e pode levar o hospedeiro à morte mais rapidamente, tanto por afetar a replicação do parasito quanto pela expansão das células imunológicas do hospedeiro. Estes mesmos autores sugeriram também que a infecção oral poderá ser mais útil em análises *in vivo* e mais real quando se trata da resposta do sistema imunológico contra *T. gondii*, assim como, para estudos de candidatos terapêuticos a medicamentos e tratamentos desta toxoplasmose.

Atualmente, o exercício físico tem sido utilizado para prevenir e tratar muitas doenças, como uma terapia não farmacológica em estudos *in vitro* (WALSH et al., 2011a; WALSH et al., 2011b). Assim, sugere-se para experimentos futuros que estudem a modulação do exercício físico na resposta imunológica contra o *T. gondii*, e que tanto o modelo animal utilizado quanto a via de infecção escolhida sejam adequados aos objetivos propostos.

No protocolo experimental estudado optou-se por exercícios não estimulados (e.g.: por estimulação elétrica). Abordados por Lerman e colaboradores (2002) que pesquisaram, dentre várias linhagens de camundongos, os animais C57BL/6J e encontraram que estes animais apresentaram os mais altos níveis de rendimento aeróbico com a corrida voluntária sem eletroestimulação, e os mais baixos níveis quando forçados (estímulo elétrico). Em teste piloto ao protocolo experimental foi realizado um experimento com adicional máximo de velocidade durante seis semanas com camundongos C57BL/6, e estes camundongos alcançaram velocidade de até 20 m/min. Estes dados foram similares aos relatados previamente (18.6 ± 6.1 m/min) também por Lerman e colaboradores (2002). No que se refere à velocidade (14 m/min)

adotada neste protocolo, como sendo a de segurança, é a de manutenção do estado ativo dos camundongos a fim de se evitar injúrias. Além disso, no primeiro conjunto de experimentos, os camundongos eram mais jovens (4-13 semanas) do que os utilizados por Lerman e colaboradores (2002) durante a corrida voluntária em que estavam com 5-6 meses de vida.

Para o presente estudo o protocolo experimental enfatizou as inter-relações entre a prática de exercícios físicos regulares e a modulação do sistema imunológico frente à infecção por *T. gondii*. Assim foram utilizadas velocidade de corrida moderada no treinamento aeróbico e porcentagens menores de 1RM (60-80%) no treinamento resistido. Além de se evitar as análises de lactato, devido ao fator estressor que a coleta regular de sangue poderia causar nos animais.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o ganho de força que o treino resistido promoveu aos camundongos que utilizaram o aparato de escalada. Este aparato foi validado para a realização de exercícios físicos resistidos por camundongos, no que se refere ao ganho de força, e apresenta a possibilidade de se avaliar a ocorrência de hipertrofia muscular esquelética nestes animais.

Foi demonstrado no presente modelo experimental que uma maior produção de IFN- γ em paralelo à manutenção das taxas de IL-10, permitiu uma maior razão de IFN- γ /IL10, caracterizando uma resposta imune com perfil Th1, que é considerada protetora contra *T. gondii*.

Em adição, não foi detectada diferença significativa na carga parasitária cerebral entre animais jovens exercitados e sedentários.

Finalmente, foi demonstrado que exercícios físicos regulares (aeróbicos e resistidos) interferiram benéficamente na estimulação do sistema imune do hospedeiro, uma vez que estes foram capazes de prolongar a vida de camundongos infectados por este parasito.

E sugere-se que, na busca do conhecimento sobre os efeitos regulatórios do exercício físico no sistema imune de animais infectados com *T. gondii*, futuras pesquisas sejam realizadas também com camundongos fêmeas, e ambos os gêneros em diferentes fases da vida, especialmente a senil. Além disso, faz-se necessário pesquisar o grau de modulação do sistema imunológico que os exercícios físicos aeróbicos e resistidos, isoladamente, possam promover nestes mesmos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. 2012. 545 ISBN 978-1-4377-1528-6.

ABDOLI, A.; DALIMI, A.; MOVAHEDIN, M. Impaired reproductive function of male rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Andrologia**, v. 44 Suppl 1, p. 679-87, May 2012.

AKERSTROM, T. et al. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 563, n. Pt 2, p. 507-16, Mar 1 2005.

ALEXANDER, D. L. et al. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathog**, v. 1, n. 2, p. e17, Oct 2005.

ALIBERTI, J.; SHER, A. Role of G-protein-coupled signaling in the induction and regulation of dendritic cell function by *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect**, v. 4, n. 9, p. 991-7, Jul 2002.

ALMEIDA, P. W. et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 1, p. 261-5, Jul 2009.

ALWAY, S. E. et al. Muscle hypertrophy models: applications for research on aging. **Can J Appl Physiol**, v. 30, n. 5, p. 591-624, Oct 2005.

ANGELONI, M. B. et al. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**, v. 30, n. 9, p. 785-91, Sep 2009.

ARAUJO, A. B. et al. Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men: estimates from the Massachusetts Male Aging Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 12, p. 5920-6, Dec 2004.

ARNOLD, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med**, v. 204, n. 5, p. 1057-69, May 14 2007.

ASTRAND, P. O. et al. Cardiac Output during Submaximal and Maximal Work. **J Appl Physiol**, v. 19, p. 268-74, Mar 1964.

ATREYA, R. et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. **Nat Med**, v. 6, n. 5, p. 583-8, May 2000.

BACHI, A. L. et al. Increased production of autoantibodies and specific antibodies in response to influenza virus vaccination in physically active older individuals. **Results Immunol**, v. 3, p. 10-6, 2013.

BALLAK, S. B. et al. Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: A comparison of muscle aging in men and male rodents. **Ageing Res Rev**, v. 14C, p. 43-55, Mar 2014.

BARBOSA, B. F. et al. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 624-30, Jul 2007.

BENNETT, J. A. et al. Definitions of sedentary in physical-activity-intervention trials: a summary of the literature. **J Aging Phys Act**, v. 14, n. 4, p. 456-77, Oct 2006.

BENTEN, W. P. et al. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone. **J Endocrinol**, v. 153, n. 2, p. 275-81, May 1997.

BENTEN, W. P.; WUNDERLICH, F.; MOSSMANN, H. Testosterone-induced suppression of self-healing *Plasmodium chabaudi* malaria: an effect not mediated by androgen receptors? **J Endocrinol**, v. 135, n. 3, p. 407-13, Dec 1992.

BEY, L. et al. Patterns of global gene expression in rat skeletal muscle during unloading and low-intensity ambulatory activity. **Physiol Genomics**, v. 13, n. 2, p. 157-67, Apr 16 2003.

BHADRA, R.; GUAN, H.; KHAN, I. A. Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8 T cell response against *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10842, 2010.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 3, p. 607-23, Sep 2000.

BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. **J Immunol**, v. 165, n. 8, p. 4515-21, Oct 15 2000.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infect Immun**, v. 61, n. 3, p. 1141-5, Mar 1993.

BONENFANT, C. et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1605-12, Mar 2001.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 79-88, Jan 2008.

BORGER, P. et al. IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **J Immunol**, v. 156, n. 4, p. 1333-8, Feb 15 1996.

BORTOLINI, M. J.; REIS, I. T.; MINEO, J. R. Open letter to all authorities and institutions involved in managing curricula of physical education in Brazil. **Exerc Immunol Rev**, v. 19, p. 164-5, 2013.

BOURGUIN, I. et al. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. **Infect Immun**, v. 66, n. 10, p. 4867-74, Oct 1998.

BREINICH, M. S. et al. A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. **Curr Biol**, v. 19, n. 4, p. 277-86, Feb 24 2009.

BUTCHER, B. A. et al. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. **J Immunol**, v. 167, n. 4, p. 2193-201, Aug 15 2001.

BUTCHER, B. A. et al. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3148-52, Mar 15 2005.

BUZONI-GATEL, D. et al. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 535-44, Apr 2006.

CANADA, H. **Canada's Physical Activity Guide to Healthy Active Living for Older Adults**. Ottawa, Canada 2009.

CAO, J. et al. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in Plasmodium falciparum merozoites. **Parasitol Int**, v. 58, n. 1, p. 29-35, Mar 2009.

CARBO, N. et al. Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. **Biochim Biophys Acta**, v. 1526, n. 1, p. 17-24, Apr 3 2001.

CAREY, A. L. et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. **Diabetes**, v. 55, n. 10, p. 2688-97, Oct 2006.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 126-31, Mar-Apr 1985.

CHAN, M. H. et al. Altering dietary nutrient intake that reduces glycogen content leads to phosphorylation of nuclear p38 MAP kinase in human skeletal muscle: association with IL-6 gene transcription during contraction. **FASEB J**, v. 18, n. 14, p. 1785-7, Nov 2004.

CHAO, C. C. et al. Effects of swimming exercise on the pathogenesis of acute murine *Toxoplasma gondii* Me49 infection. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 62, n. 2, p. 220-6, Feb 1992.

CHAZAUD, B. et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **J Cell Biol**, v. 163, n. 5, p. 1133-43, Dec 8 2003.

CHEN, H.; GE, R. S.; ZIRKIN, B. R. Leydig cells: From stem cells to aging. **Mol Cell Endocrinol**, v. 306, n. 1-2, p. 9-16, Jul 10 2009.

CHESLEY, A. et al. Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 73, n. 4, p. 1383-8, Oct 1992.

CHIN, E. R. et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. **Genes Dev**, v. 12, n. 16, p. 2499-509, Aug 15 1998.

CHODZKO-ZAJKO, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 7, p. 1510-30, Jul 2009.

COURRET, N. et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309-16, Jan 1 2006.

CRAMPES, F. et al. Effect of physical training in humans on the response of isolated fat cells to epinephrine. **J Appl Physiol (1985)**, v. 61, n. 1, p. 25-9, Jul 1986.

CROLEY, A. N. et al. Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women. **J Appl Physiol (1985)**, v. 99, n. 5, p. 1872-9, Nov 2005.

DAUBNER, S. C.; HILLAS, P. J.; FITZPATRICK, P. F. Characterization of chimeric pterin-dependent hydroxylases: contributions of the regulatory domains of tyrosine and phenylalanine hydroxylase to substrate specificity. **Biochemistry**, v. 36, n. 39, p. 11574-82, Sep 30 1997.

DE MOURA, L. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 2, p. 326-9, Feb 2006.

DENKERS, E. Y. et al. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 159, n. 4, p. 1903-8, Aug 15 1997.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. **N Engl J Med**, v. 290, n. 20, p. 1110-6, May 16 1974.

DEVOL, D. L. et al. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. **Am J Physiol**, v. 259, n. 1 Pt 1, p. E89-95, Jul 1990.

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. **Am J Vet Res**, v. 49, n. 6, p. 910-3, Jun 1988.

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

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J Protozool**, v. 19, n. 1, p. 155-77, Feb 1972.

_____. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **J Protozool**, v. 23, n. 4, p. 537-46, Nov 1976.

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

DUBREMETZ, J. F.; SCHWARTZMAN, J. D. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. **Res Immunol**, v. 144, n. 1, p. 31-3, Jan 1993.

DURANTE, P. E. et al. Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 1, p. E178-86, Jul 2002.

FAIGENBAUM, A. D. et al. Youth resistance training: updated position statement paper from the national strength and conditioning association. **J Strength Cond Res**, v. 23, n. 5 Suppl, p. S60-79, Aug 2009.

FEBBRAIO, M. A. et al. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. **J Physiol**, v. 549, n. Pt 2, p. 607-12, Jun 1 2003.

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

_____. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133-48, Mar 2009.

FERNANDEZ-GONZALO, R. et al. Muscle damage responses and adaptations to eccentric-overload resistance exercise in men and women. **Eur J Appl Physiol**, v. 114, n. 5, p. 1075-84, May 2014.

FERRARA, N. et al. Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. **Rejuvenation Res**, v. 11, n. 1, p. 139-50, Feb 2008.

FERREIRA, I. M. et al. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 2, p. 221-7, Feb 2008.

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

_____. Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. **J Exp Biol**, v. 216, n. Pt 1, p. 127-33, Jan 1 2013.

FLEGR, J. et al. Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. **BMC Infect Dis**, v. 2, p. 11, Jul 2 2002.

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

FLETCHER, G. F. et al. Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 104, n. 14, p. 1694-740, Oct 2 2001.

FLORES, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J**, v. 22, n. 10, p. 3661-71, Oct 2008.

FORDYCE, D. E.; WEHNER, J. M. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Brain Res**, v. 619, n. 1-2, p. 111-9, Aug 13 1993.

FOX, B. A.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 3, p. 323-31, Mar 9 2004.

GARDNER, I. D.; REMINGTON, J. S. Aging and the immune response. I. Antibody formation and chronic infection in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **J Immunol**, v. 120, n. 3, p. 939-43, Mar 1978a.

_____. Aging and the immune response. II. Lymphocyte responsiveness and macrophage activation in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **J Immunol**, v. 120, n. 3, p. 944-9, Mar 1978b.

GARRETT, W. E. J.; BEST, T. M. **Orthopaedic basic science**. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.

GARRY, D. J.; KANATOUS, S. B.; MAMMEN, P. P. Emerging roles for myoglobin in the heart. **Trends Cardiovasc Med**, v. 13, n. 3, p. 111-6, Apr 2003.

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

GAZZINELLI, R. et al. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 149, n. 1, p. 175-80, Jul 1 1992.

GAZZINELLI, R. T. et al. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J Immunol**, v. 146, n. 1, p. 286-92, Jan 1 1991.

GAZZINELLI, R. T. et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 153, n. 6, p. 2533-43, Sep 15 1994.

GIGLEY, J. P.; FOX, B. A.; BZIK, D. J. Long-term immunity to lethal acute or chronic type II *Toxoplasma gondii* infection is effectively induced in genetically susceptible C57BL/6 mice by immunization with an attenuated type I vaccine strain. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5380-8, Dec 2009.

GIL, M. P. et al. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 12, p. 6680-5, Jun 5 2001.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 1974-84, Oct 2005.

GLEESON, M. Interleukins and exercise. **J Physiol**, v. 529 Pt 1, p. 1, Nov 15 2000.

GOEBEL, S.; GROSS, U.; LUDER, C. G. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 19, p. 3495-505, Oct 2001.

GOMEZ-CABRERA, M. C. et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 1, p. 142-9, Jan 2008.

GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**, v. 17, n. 11, p. 977-86, Nov 1995.

GRABSTEIN, K. H. et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. **Science**, v. 264, n. 5161, p. 965-8, May 13 1994.

GREALY, M. A.; JOHNSON, D. A.; RUSHTON, S. K. Improving cognitive function after brain injury: the use of exercise and virtual reality. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 80, n. 6, p. 661-7, Jun 1999.

GREENWALD, R.; FERDINANDS, J. M.; TEAGUE, W. G. Ionic determinants of exhaled breath condensate pH before and after exercise in adolescent athletes. **Pediatr Pulmonol**, v. 44, n. 8, p. 768-77, Aug 2009.

GUIMARAES, E. V.; DE CARVALHO, L.; BARBOSA, H. S. Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. **J Parasitol**, v. 94, n. 1, p. 72-83, Feb 2008.

HAFID, J. et al. Comparison of PCR, capture ELISA and immunoblotting for detection of *Toxoplasma gondii* in infected mice. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 12, p. 1100-4, Dec 2001.

HAKIM, F. T. et al. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. **J Immunol**, v. 147, n. 7, p. 2310-6, Oct 1 1991.

HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 3, p. 179-89, Sep 2007.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463-9, Jul 24 2008.

HARRISON, D. E. Representative age ranges for mature life history stages in C57BL/6J mice; comparison to human beings. 2011. Disponível em: <<http://research.jax.org/faculty/harrison/ger1vLifespan1.html#top>>. Acesso em: 2014/02/08.

HASKELL, W. L. et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**, v. 116, n. 9, p. 1081-93, Aug 28 2007.

HAUGEN, F. et al. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 4, p. C807-16, Apr 2010.

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

HENRY, L.; BEVERLEY, K. A. Age and sex differences in the response of lymph node post-capillary venules in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Br J Exp Pathol**, v. 57, n. 3, p. 274-80, Jun 1976.

HERMANSEN, L.; WACHTLOVA, M. Capillary density of skeletal muscle in well-trained and untrained men. **J Appl Physiol**, v. 30, n. 6, p. 860-3, Jun 1971.

HIPPE, D. et al. Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 2905-12, Jul 2008.

HO, A. D.; WAGNER, W.; MAHLKNECHT, U. Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. **EMBO Rep**, v. 6 Spec No, p. S35-8, Jul 2005.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 242, n. 9, p. 2278-82, May 10 1967.

HOLLOSZY, J. O.; BOOTH, F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. **Annu Rev Physiol**, v. 38, p. 273-91, 1976.

HOLUB, D. et al. Differences in onset of disease and severity of psychopathology between toxoplasmosis-related and toxoplasmosis-unrelated schizophrenia. **Acta Psychiatr Scand**, v. 127, n. 3, p. 227-38, Mar 2013.

HOU, B. et al. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 1, p. 278-83, Jan 4 2011.

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

HOWLEY, E. T. Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S364-9; discussion S419-20, Jun 2001.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 766-78, Nov 2012.

HUTBER, C. A.; HARDIE, D. G.; WINDER, W. W. Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase. **Am J Physiol**, v. 272, n. 2 Pt 1, p. E262-6, Feb 1997.

JACKSON, L. **Mouse Phenome Database** 2014.

JEQUIER, E. Thermogenic responses induced by nutrients in man: their importance in energy balance regulation. **Experientia Suppl**, v. 44, p. 26-44, 1983.

JEWELL, J. L.; RUSSELL, R. C.; GUAN, K. L. Amino acid signalling upstream of mTOR. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 3, p. 133-9, Mar 2013.

JOHNSON, A. M. Strain-dependent, route of challenge-dependent, murine susceptibility to toxoplasmosis. **Z Parasitenkd**, v. 70, n. 3, p. 303-9, 1984.

JOHNSON, L. L.; GIBSON, G. W.; SAYLES, P. C. Preimmune resistance to *Toxoplasma gondii* in aged and young adult mice. **J Parasitol**, v. 81, n. 6, p. 894-9, Dec 1995.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne toxoplasmosis. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 6, p. 845-51, Sep 2012.

JOSTOCK, T. et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 1, p. 160-7, Jan 2001.

KADI, F. et al. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. **Muscle Nerve**, v. 29, n. 1, p. 120-7, Jan 2004.

KADI, F. et al. The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? **Pflugers Arch**, v. 451, n. 2, p. 319-27, Nov 2005.

KAECH, S. M. et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 12, p. 1191-8, Dec 2003.

KAGEYAMA, K. et al. Cytokines induce NF-kappaB, Nurr1 and corticotropin-releasing factor gene transcription in hypothalamic 4B cells. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 5, p. 305-13, 2010.

KANDA, N.; TSUCHIDA, T.; TAMAKI, K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. **Clin Exp Immunol**, v. 106, n. 2, p. 410-5, Nov 1996.

KANG, K. N. et al. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. **Korean J Parasitol**, v. 44, n. 3, p. 209-19, Sep 2006.

KANKOVA, S.; KODYM, P.; FLEGR, J. Direct evidence of *Toxoplasma*-induced changes in serum testosterone in mice. **Exp Parasitol**, v. 128, n. 3, p. 181-3, Jul 2011.

KARALIS, K. et al. CRH and the immune system. **J Neuroimmunol**, v. 72, n. 2, p. 131-6, Feb 1997.

KASPER, L. H.; MATSUURA, T.; KHAN, I. A. IL-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 155, n. 10, p. 4798-804, Nov 15 1995.

KELLER, C. et al. Differential regulation of IL-6 and TNF-alpha via calcineurin in human skeletal muscle cells. **Cytokine**, v. 36, n. 3-4, p. 141-7, Nov 2006.

KELLER, C. et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB J**, v. 15, n. 14, p. 2748-50, Dec 2001.

KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J Immunol**, v. 152, n. 4, p. 1856-60, Feb 15 1994.

KIM, L.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 10, p. 2119-26, May 15 2006.

KIM, S. K.; FOUTS, A. E.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. **J Immunol**, v. 178, n. 8, p. 5154-65, Apr 15 2007.

KIRKMAN, L. A.; WEISS, L. M.; KIM, K. Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. **Infect Immun**, v. 69, n. 1, p. 148-53, Jan 2001.

KITTAS, S. et al. A histological and immunohistochemical study of the changes induced in the brains of white mice by infection with *Toxoplasma gondii*. **Br J Exp Pathol**, v. 65, n. 1, p. 67-74, Feb 1984.

KRAMER, A. F. et al. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 418-9, Jul 29 1999.

KRANIYOU, Y. et al. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 2, p. 794-6, Feb 2000.

LANG, C. et al. Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 1994-2005, Jul 2006.

LASKIN, D. L.; LASKIN, J. D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. **Toxicology**, v. 160, n. 1-3, p. 111-8, Mar 7 2001.

LAURIN, D. et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol**, v. 58, n. 3, p. 498-504, Mar 2001.

LAWRIE, R. A. Effect of enforced exercise on myoglobin concentration in muscle. **Nature**, v. 171, n. 4363, p. 1069-70, Jun 13 1953.

LEEUWENBURGH, C. et al. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **Am J Physiol**, v. 267, n. 2 Pt 2, p. R439-45, Aug 1994.

LERMAN, I. et al. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 6, p. 2245-55, Jun 2002.

LESER, P. G. et al. Comparison of semi-automatized assays for anti-*T. gondii* IgG detection in low-reactivity serum samples: importance of the results in patient counseling. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, p. 107-10, 2003.

LIESENFELD, O. et al. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 597-607, Aug 1 1996.

LIM, A. et al. *Toxoplasma gondii* infection enhances testicular steroidogenesis in rats. **Mol Ecol**, v. 22, n. 1, p. 102-10, Jan 2013.

LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797-801, Aug 15 2002.

LINDSAY, D. S. et al. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. **J Parasitol**, v. 77, n. 1, p. 126-32, Feb 1991.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LIU, C. H. et al. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 31-5, Jul 1 2006.

LOPEZ-OTIN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194-217, Jun 6 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LUDER, C. G.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 289, p. 219-37, 2005.

LUDER, C. G. et al. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 5, p. 1475-84, May 2001.

LUFT, B. J. et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. **N Engl J Med**, v. 329, n. 14, p. 995-1000, Sep 30 1993.

LUO, L. et al. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 4, p. 427-36, Apr 2013.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 5, p. 198-201, May 2002.

MA, A.; KOKA, R.; BURKETT, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 657-79, 2006.

MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. **Scand J Med Sci Sports**, v. 16, n. 1, p. 4-6, Feb 2006.

MARKHAM, J. A. Sex steroids and schizophrenia. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 13, n. 3, p. 187-207, Sep 2012.

MASHAYEKHI, M. et al. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 249-59, Aug 26 2011.

MCCONKEY, G. A. et al. *Toxoplasma gondii* infection and behaviour - location, location, location? **J Exp Biol**, v. 216, n. Pt 1, p. 113-9, Jan 1 2013.

MCGUIRE, S. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, January 2011. **Adv Nutr**, v. 2, n. 3, p. 293-4, May 2011.

MCLEOD, R. et al. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. **J Infect Dis**, v. 149, n. 2, p. 234-44, Feb 1984.

MEYER, D. J.; ALLAN, J. E.; BEAMAN, M. H. Effect of route of infection on outcome of *Toxoplasma gondii* infection in hu-PBL SCID mice. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v. 3, n. 1, p. 28-35, Mar 2013.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect Immun**, v. 27, n. 2, p. 283-7, Feb 1980.

MOCCHEGIANI, E.; MALAVOLTA, M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p. 177-84, Aug 2004.

MONTOYA, J. G.; HUFFMAN, H. B.; REMINGTON, J. S. Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4627-31, Oct 2004.

MONTOYE, H. J. **Physical activity and health: an epidemiologic study of an entire community**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc. 1975.

MOREIRA, N. M. et al. Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Parasitol**, v. 141C, p. 68-74, Mar 22 2014.

MOUTON, S. et al. The free-living flatworm *Macrostomum lignano*: a new model organism for ageing research. **Exp Gerontol**, v. 44, n. 4, p. 243-9, Apr 2009.

NAM, H. W.; AHN, H. J.; YANG, H. J. Pro-inflammatory cytokine expression of spleen dendritic cells in mouse toxoplasmosis. **Korean J Parasitol**, v. 49, n. 2, p. 109-14, Jun 2011.

NARASIMHAN, J. et al. Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem**, v. 283, n. 24, p. 16591-601, Jun 13 2008.

NASH, P. B. et al. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. **J Immunol**, v. 160, n. 4, p. 1824-30, Feb 15 1998.

NAVARRA, P. et al. Interleukins-1 and -6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. **Endocrinology**, v. 128, n. 1, p. 37-44, Jan 1991.

NELSON, M. E. et al. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 8, p. 1435-45, Aug 2007.

NETO, J. C. et al. Importance of exercise immunology in health promotion. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1165-72, Nov 2011.

NEWHAM, D. J.; JONES, D. A.; EDWARDS, R. H. Large delayed plasma creatine kinase changes after stepping exercise. **Muscle Nerve**, v. 6, n. 5, p. 380-5, Jun 1983.

NGUYEN, T. D. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 6, p. 635-9, Nov 1996.

NICASTRO, H. et al. Functional and morphological effects of resistance exercise on disuse-induced skeletal muscle atrophy. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 11, p. 1070-9, Nov 2011.

NIELSEN, A. R. et al. Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fibre type composition. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 1, p. 305-12, Oct 1 2007.

NIELSEN, J. N. et al. 5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 94, n. 2, p. 631-41, Feb 2003.

NIEMAN, D. C. Exercise, infection, and immunity. **Int J Sports Med**, v. 15 Suppl 3, p. S131-41, Oct 1994.

NIEMAN, D. C. et al. Cytokine changes after a marathon race. **J Appl Physiol (1985)**, v. 91, n. 1, p. 109-14, Jul 2001.

OHNO, H. et al. Immunohistochemical study on androgen receptors in the anterior cruciate ligament in dogs. **Okajimas Folia Anat Jpn**, v. 90, n. 2, p. 31-9, 2013.

OSTROWSKI, K. et al. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. **J Physiol**, v. 513 (Pt 3), p. 889-94, Dec 15 1998.

OSTROWSKI, K. et al. Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. **Eur J Appl Physiol**, v. 84, n. 3, p. 244-5, Mar 2001.

OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B. K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 83, n. 6, p. 512-5, Dec 2000.

PAWELEC, G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? **Mech Ageing Dev**, v. 108, n. 1, p. 1-7, Apr 1 1999.

PAYNE, T. M.; MOLESTINA, R. E.; SINAI, A. P. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 21, p. 4345-58, Nov 1 2003.

PEDERSEN, B. K. et al. Role of myokines in exercise and metabolism. **J Appl Physiol (1985)**, v. 103, n. 3, p. 1093-8, Sep 2007.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, Oct 2008.

PENG, H. J.; CHEN, X. G.; LINDSAY, D. S. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. **J Parasitol**, v. 97, n. 4, p. 620-8, Aug 2011.

PERSSON, E. K. et al. Death receptor ligation or exposure to perforin trigger rapid egress of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 179, n. 12, p. 8357-65, Dec 15 2007.

PESCATELLO, L. S. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 3, p. 533-53, Mar 2004.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005.

PETRALIA, R. S.; MATTSON, M. P.; YAO, P. J. Aging and longevity in the simplest animals and the quest for immortality. **Ageing Res Rev**, Jun 5 2014.

PHILLIPS, S. M. et al. Effects of training duration on substrate turnover and oxidation during exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 81, n. 5, p. 2182-91, Nov 1996.

PIEKARSKI, G. Behavioral alterations caused by parasitic infection in case of latent toxoplasma infection. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, v. 250, n. 3, p. 403-6, Sep 1981.

PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

POLLOCK, M. L. et al. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. **Circulation**, v. 101, n. 7, p. 828-33, Feb 22 2000.

PRANDOVSKY, E. et al. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e23866, 2011.

PROKOPCHUK, O. et al. Skeletal muscle IL-4, IL-4R α , IL-13 and IL-13R α 1 expression and response to strength training. **Exerc Immunol Rev**, v. 13, p. 67-75, 2007.

REIS E SOUSA, C. et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J Exp Med**, v. 186, n. 11, p. 1819-29, Dec 1 1997.

RIEDIKER, M.; DANUSER, B. Exhaled breath condensate pH is increased after moderate exercise. **J Aerosol Med**, v. 20, n. 1, p. 13-8, Spring 2007.

RIZZOLI, R. et al. Quality of life in sarcopenia and frailty. **Calcif Tissue Int**, v. 93, n. 2, p. 101-20, Aug 2013.

ROBERTS, C. W.; CRUICKSHANK, S. M.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. **Infect Immun**, v. 63, n. 7, p. 2549-55, Jul 1995.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 3, p. 476-88, Jul 2001.

ROBERTS, F.; MCLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitol Today**, v. 15, n. 2, p. 51-7, Feb 1999.

RODGERS, G. M.; FISHER, J. W.; GEORGE, W. J. The role of renal adenosine 3',5'-monophosphate in the control of erythropoietin production. **Am J Med**, v. 58, n. 1, p. 31-8, Jan 1975.

ROMEO, J. et al. Physical activity, immunity and infection. **Proc Nutr Soc**, v. 69, n. 3, p. 390-9, Aug 2010.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scand J Infect Dis**, v. 44, n. 11, p. 805-14, Nov 2012.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, n. 2815, p. 660-3, Dec 10 1948.

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

SALTIN, B.; ROWELL, L. B. Functional adaptations to physical activity and inactivity. **Fed Proc**, v. 39, n. 5, p. 1506-13, Apr 1980.

SANT'ANA PEREIRA, J. A. et al. Myosin heavy chain isoform expression and high energy phosphate content in human muscle fibres at rest and post-exercise. **J Physiol**, v. 496 (Pt 2), p. 583-8, Oct 15 1996.

SATO, K. et al. Resistance training restores muscle sex steroid hormone steroidogenesis in older men. **FASEB J**, v. 28, n. 4, p. 1891-7, Apr 2014.

SCHANTZ, P.; HENRIKSSON, J.; JANSSON, E. Adaptation of human skeletal muscle to endurance training of long duration. **Clin Physiol**, v. 3, n. 2, p. 141-51, Apr 1983.

SCHEBELESKI-SOARES, C. et al. Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 4, p. 659-65, Aug 2009.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 77, n. 2, p. 493-501, Aug 1994.

SCHLUNS, K. S.; LEFRANCOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 269-79, Apr 2003.

SCHOOLEY, J. C.; MAHLMANN, L. J. Adenosine, AMP, cyclic AMP, theophylline and the action and production of erythropoietin. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 150, n. 1, p. 215-9, Oct 1975.

SHARMA, R. K.; DASH, B. **Caraka Samhita**. Varanasi, India: Chowkhamba Sanskrit Bhawan, 2008.

SHEPHARD, R. J. Development of the discipline of exercise immunology. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 194-222, 2010.

SHIMIZU, K. et al. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. **Exerc Immunol Rev**, v. 14, p. 24-37, 2008.

SHIRAHATA, T. et al. Correlation between increased susceptibility to primary *Toxoplasma gondii* infection and depressed production of gamma interferon in pregnant mice. **Microbiol Immunol**, v. 36, n. 1, p. 81-91, 1992.

SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annu Rev Microbiol**, v. 62, p. 329-51, 2008.

SILVA, N. M. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*:

induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect Immun**, v. 70, n. 2, p. 859-68, Feb 2002a.

SILVA, N. M. et al. *Toxoplasma gondii*: in vivo expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNF p55 receptor and inducible nitric oxide synthase functions. **Microbes Infect**, v. 4, n. 3, p. 261-70, Mar 2002b.

SIMPSON, R. J.; BOSCH, J. A. Special issue on exercise immunology: Current perspectives on aging, health and extreme performance. **Brain Behav Immun**, Mar 25 2014.

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

SMERDU, V. et al. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 267, n. 6 Pt 1, p. C1723-8, Dec 1994.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-7, May 22 1987.

SNOW, M. H. Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. **Anat Rec**, v. 227, n. 4, p. 437-46, Aug 1990.

SOETE, M.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Exp Parasitol**, v. 78, n. 4, p. 361-70, Jun 1994.

SOUSA E SILVA, T. et al. Prolonged physical training decreases mRNA levels of glucocorticoid receptor and inflammatory genes. **Horm Res Paediatr**, v. 74, n. 1, p. 6-14, 2010.

SPANGENBURG, E. E.; BOOTH, F. W. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. **Acta Physiol Scand**, v. 178, n. 4, p. 413-24, Aug 2003.

SPIPKER, B. **Quality of life and pharmacoeconomics in clinical trials**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

STEENSBERG, A. et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. **J Physiol**, v. 537, n. Pt 2, p. 633-9, Dec 1 2001.

STEENSBERG, A. et al. Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle. **FASEB J**, v. 21, n. 11, p. 2683-94, Sep 2007.

STEENSBERG, A. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **J Physiol**, v. 529 Pt 1, p. 237-42, Nov 15 2000.

STIBBS, H. H. Neurochemical and activity changes in rats infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. **J Parasitol**, v. 70, n. 3, p. 428-32, Jun 1984.

STUTZ, A. et al. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology**, v. 217, n. 1, p. 28-36, Jan 2012.

SU, C. et al. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 414-6, Jan 17 2003.

SUWA, M. et al. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. **Metabolism**, v. 57, n. 7, p. 986-98, Jul 2008.

SUZUKI, Y.; CONLEY, F. K.; REMINGTON, J. S. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. **J Immunol**, v. 143, n. 6, p. 2045-50, Sep 15 1989.

SUZUKI, Y.; YANG, Q.; REMINGTON, J. S. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 81, n. 6, p. 1032-4, Dec 1995.

TANG, L.; WANG, Y. **Climbing ladder for resistance exercise of animal** Espacenet Patent search. NORMAL, U. S. China 2011.

TAYLOR, S. et al. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1776-80, Dec 15 2006.

TERRA, R. et al. Exercise improves the Th1 response by modulating cytokine and NO production in BALB/c mice. **Int J Sports Med**, v. 34, n. 7, p. 661-6, Jul 2013.

TERRAZAS, C. A. et al. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 348-58, Nov 2010.

TOTH, K. G. et al. IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17392, 2011.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 1-71, Jan 1999.

US. Exercise prescription for older adults with osteoarthritis pain: consensus practice recommendations. A supplement to the AGS Clinical Practice Guidelines on the management of chronic pain in older adults. **J Am Geriatr Soc**, v. 49, n. 6, p. 808-23, Jun 2001.

_____. In: (Ed.). **Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General**. Rockville (MD), 2004. (Reports of the Surgeon General).

UTSUYAMA, M. et al. Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood. **Mech Ageing Dev**, v. 63, n. 1, p. 57-68, Mar 15 1992.

VALLEJO, A. N. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. **Immunol Rev**, v. 205, p. 158-69, Jun 2005.

VENIHAKI, M. et al. Corticotropin-releasing hormone regulates IL-6 expression during inflammation. **J Clin Invest**, v. 108, n. 8, p. 1159-66, Oct 2001.

VUTOVA, P. et al. *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 1556-70, Jun 2007.

VYAS, A. Parasite-augmented mate choice and reduction in innate fear in rats infected by *Toxoplasma gondii*. **J Exp Biol**, v. 216, n. Pt 1, p. 120-6, Jan 1 2013.

WAHAB, T. et al. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 591-2, Feb 2010.

WALKER, W. et al. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. **Infect Immun**, v. 65, n. 3, p. 1119-21, Mar 1997.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part two: Maintaining immune health. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 64-103, 2011a.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011b.

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. Detecting the Threshold of Anaerobic Metabolism in Cardiac Patients during Exercise. **Am J Cardiol**, v. 14, p. 844-52, Dec 1964.

WEBSTER, J. P. et al. Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. **Proc Biol Sci**, v. 273, n. 1589, p. 1023-30, Apr 22 2006.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 8, p. 895-901, Jul 1 2009.

WHITMARSH, R. J. et al. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 3, p. 224-36, Sep 15 2011.

WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Prog Neurobiol**, v. 40, n. 5, p. 573-629, May 1993.

WHO. **Global recommendations on physical activity for health.** Geneva: World Health Organization 2010.

_____. 2014.

WILLIAMS, P. T. Inadequate exercise as a risk factor for sepsis mortality. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e79344, 2013.

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

WOOD, N. I.; GLYNN, D.; MORTON, A. J. "Brain training" improves cognitive performance and survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, v. 42, n. 3, p. 427-37, Jun 2011.

YALCIN, A. D. et al. CD40, CD45 CTLA-4 levels are elevated in healthy older adults. **Clin Lab**, v. 58, n. 5-6, p. 449-56, 2012.

YANG, Z. Z. et al. Physiological functions of protein kinase B/Akt. **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. Pt 2, p. 350-4, Apr 2004.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 2, p. 109-21, Feb 2014.

YATES, L. B. et al. Exceptional longevity in men: modifiable factors associated with survival and function to age 90 years. **Arch Intern Med**, v. 168, n. 3, p. 284-90, Feb 11 2008.

YOLKEN, R. H.; DICKERSON, F. B.; FULLER TORREY, E. *Toxoplasma* and schizophrenia. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 11, p. 706-15, Nov 2009.

ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e348, Oct 2004.

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. **J Immunol**, v. 176, n. 3, p. 1840-7, Feb 1 2006.

7 APÊNDICE

Figura 54 - Miguel e Sr. Caju (Carlos Humberto de Oliveira)



Responsável por tutorar a construção dos equipamentos e por guiar para encontrar os profissionais certos na construção dos equipamentos.

Fonte: Próprio autor (2013).

Figura 55 - Sr. Pardal (Catarino D. Alcantara).



Construiu a bobina para formar o ímã eletromagnético.

Fonte: Próprio autor (2013).

Figura 56 - Construção dos aparatos de acrílico.



Aparatos de acrílico para construção do labirinto "cruz e zero" e gaiolas para esteira.

Fonte: Próprio autor (2013).

Figura 57 - Sr. Moacir José da Silva.



Adaptação mecânica para redução da velocidade da esteira.

Fonte: Próprio autor (2013).

Figura 58 - Sr. Kaio A. Lopes



Fabricação do Labirinto em Cruz e protótipo final do aparato de escalada.

Fonte: Próprio autor (2014).

Figura 59 - Grupo de estudo de Imunologia do Exercício.



Nomes (da esquerda para direita) Wener, Cezinha, Ismail, Miguel, Pedro, Luciana, Fábio e Guilherme.

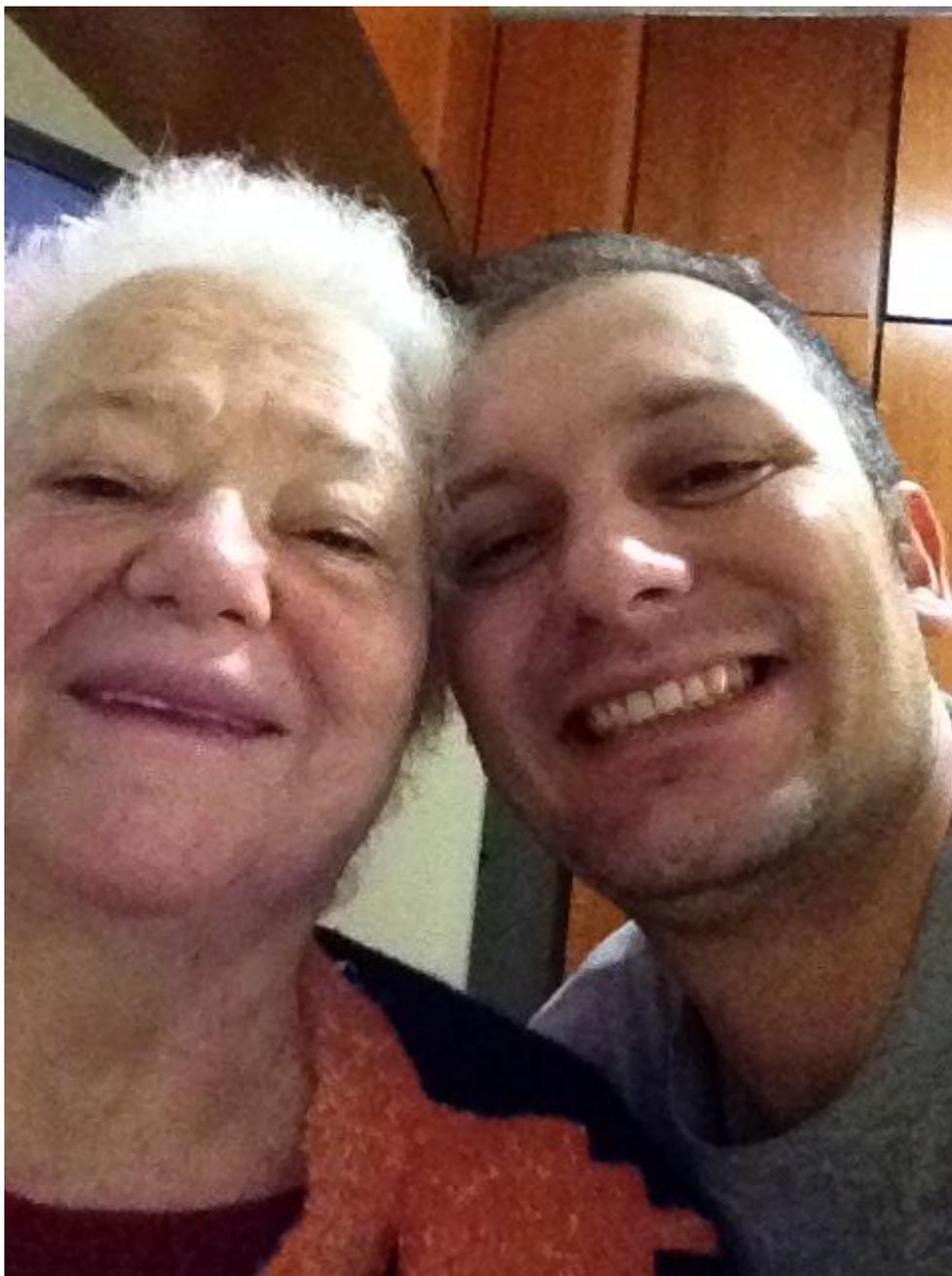
Fonte: Próprio autor (2013).

Figura 60 Equipe (amigos) do Laboratório de Imunoparasitologia.



Fonte: Próprio autor (2012).

Figura 61 - Minha mãe, Sra. Geni Luiza Sordi Bortolini.



Produziu os primeiros saquinhos para colocar as bolas de chumbo utilizadas no aparato de escalada. Além do apoio incondicional ao meu doutoramento.

Fonte: Próprio autor (2013).