

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

***Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Imunidade humoral e celular em baço e intestino de camundongos isogênicos imunizados com taquizoítos irradiados por Cobalto 60**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedico em especial....

*Aos meus pais, **Andrés e Ivani**, meus exemplos
de dignidade, força e determinação.*

*Obrigado pelo amor, carinho, dedicação, apoio
e principalmente, por confiar em mim.*

*A minha amada noiva, **Janaína**, minha
companheira e amiga. Obrigado pela
paciência, apoio e por me ajudar a
realizar meus sonhos.*

Ao meu irmão **Rodrigo** pela torcida e
apoio durante toda esta trajetória

À minha avó **Helena**, pelo amor e
carinho

É para vocês que dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.**, a quem sou muitíssimo grato pela amizade, orientação e pelos conhecimentos transmitidos durante a iniciação científica, mestrado e doutorado, contribuindo para meu crescimento científico e cultural.

À **Dr^a. Nanci do Nascimento**, pelo suporte e pelos momentos descontraídos das festas de fim de ano do CB.

Ao amigo **Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto**, pelos ensinamentos iniciais e por me permitir trabalhar conjuntamente nesse projeto. E também pelas sugestões dadas na qualificação.

Ao amigo **Dr. Patrick Jack Spencer**, pelas sugestões dadas na qualificação e pelos momentos descontraídos propiciados no IPEN.

A **Dr^a Lígia Ely Morganti Ferreira Dias e Dr^a Solange Carbonare** pelas sugestões apresentadas durante o seminário de área.

A **Janaína Baptista Alves**, pela colaboração nos ensaios de subclasses, pela revisão do texto e pela paciência e companheirismo durante este trabalho.

Ao amigo **Dr. Daniel Perez Vieira**, pela amizade, companhia nesses anos de pós-graduação e pelas ajudas indispensáveis na confecção de *primers* e na padronização das reações de real-time PCR.

Ao amigo **Felipe Pessoa de Melo Hermida**, “o *ligeirinho*”, pela amizade e pelo convívio agradável.

A amiga **Nahiara Esteves Zorgi**, “*a pequena 0,5*”, pela dedicação e importante contribuição durante o desenvolvimento deste estudo.

Ao amigo **Leonardo da Silva Augusto**, pela importante colaboração nos ensaios finais da tese.

À **Cleusa Fumica Hirata Takakura**, pelo excelente trabalho de microscopia eletrônica, realizado no Departamento de Patologia da FMUSP.

À **Roselaine Pereira Alvim Cardoso**, pelos ensinamentos, amizade, apoio e carinho, durante estes longos anos de convivência.

Aos meus colegas do Laboratório de Protozoologia: **Luciana Regina Meireles, Miriam Macre, Samanta Etel Borborema, Bárbara Fialho Carvalho, Sônia Mioranza, Ivani José da Silva, Bruna Macedo, Juliana Nunes Mecca e Camila Aparecida de Carvalho**, pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

À Dona **Francisca Lucio de Oliveira**, pelo carinho, torcida e por sempre oferecer as melhores condições de trabalho no laboratório.

Ao grande amigo **Luciano Monteiro da Silva**, pela amizade, auxílio e por nunca medir esforços na ajuda aos alunos.

À **Solange Fernandes Ferreira dos Santos**, pela amizade, conversas e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao **Dr. André Gustavo Tempone Cardoso**, pela convivência, brincadeiras e pelos conselhos.

À **Dr^a. Eufrozina S. Umezawa**, pelos empréstimos de alguns aparelhos utilizados neste projeto.

Ao **Eng. Carlos G. da Silveira** e **Eng^a. Elizabeth S. R. Somessari** por possibilitarem a irradiação das amostras utilizadas nesse projeto.

A todos os amigos que fiz no IPEN, em especial, **Murilo Casares da Silva, José Alberto Alves da Silva, Lucélia de Almeida Campos, Thiago Luiz Almeida, Priscila Caproni, Miriam Fussae Suzuki, Dr. João Ezequiel de Oliveira – “Johnny”, José Maria e Marcos A. Ribeiro Jr.**, pelos momentos agradáveis e descontraídos.

Ao **Dr. José Eduardo Levi** e **Dr. Claudio Sérgio Pannuti**, do Laboratório de Virologia (IMTSP/USP), pela disponibilidade do equipamento de real-time PCR.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro, ao **LIM49FMUSP** e ao **Centro de Biotecnologia/IPEN** pelo suporte dado ao projeto.

Aos funcionários do **Departamento de Ensino/IPEN**, pelo ótimo auxílio dado aos alunos.

A todos meus familiares que direta ou indiretamente torceram por mim. E em especial ao meu afilhado Vitor Hugo.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste projeto.

À Deus.

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertolt Brecht

RESUMO

***Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Imunidade humoral e celular em baço e intestino de camundongos isogênicos imunizados com taquizoítos irradiados por Cobalto 60**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Estudamos o desenvolvimento de uma vacina para toxoplasmose utilizando a radiação ionizante como ferramenta. Aqui avaliamos o desenvolvimento da imunidade sistêmica e intestinal e a resistência à infecção, em diferentes camundongos imunizados, por via oral e parenteral, com taquizoítos irradiados a 255 Gy e desafiados com cistos da cepa ME49. Camundongos C57Bl/6j, BALB/c e C57Bl/6j IFN- γ ^{-/-} foram imunizados com 10⁷ taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy por diferentes vias. As preparações de taquizoítos irradiados, por via oral e parenteral, induziram produção de imunoglobulinas IgG e IgA no soro de camundongos, sendo predominante a subclasse de IgG2b, determinadas por ELISA. A produção de IgM foi mínima. Os animais imunizados pela via parenteral, apresentaram uma maturação mais rápida da avidéz de anticorpos IgG que os animais imunizados por via oral. Houve excreção de IgG, IgA e IgM nas fezes dos animais imunizados, mais intensa nos animais imunizados por via oral. No estudo da imunidade celular induzida por antígeno e detectada por *real-time* PCR, houve uma grande produção de IFN- γ por células esplênicas, menor por células das placas de Peyer intestinais, onde houve maior produção de IL-2. Houve proteção em todos os nossos esquemas avaliados, maior nos animais BALB/c. Os animais deficientes de IFN- γ , não foram afetados pelo processo de imunização e apresentaram produção de IgG e IgA sérico e excreção de S-IgA e S-IgM nas fezes, com menor número de cistos cerebrais em animais imunizados por via parenteral. Todos nossos dados apontam para a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina oral para toxoplasmose, utilizando taquizoítos irradiados, com aplicação prática na imunização de felinos domésticos e selvagens.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, radiação ionizante, imunidade de mucosa, vacina

ABSTRACT

***Toxoplasma gondii* vs ionizing radiation: Cell and humoral immunity in spleen and gut of isogenic mice immunized with ⁶⁰Co irradiated tachyzoites.**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

We are developing a vaccine for toxoplasmosis, using ionizing radiation as a tool. Here we analyzed the production of systemic and intestinal immunity, with protection studies, in several strains of inbred mice, by oral or parenteral route, using 255 Gy irradiated tachyzoites of *T. gondii* RH strain, with challenge with cysts of ME-49 strain. C57Bl/6j, BALB/c and C57Bl/6j IFN- γ ^{-/-} mice were immunized with 10⁷ irradiated tachyzoites, by parenteral or oral route. Those preparations, both by parenteral or oral routes, induced the production of specific IgG, mainly of the IgG2b subclass, and IgA immunoglobulins in serum, as determined by ELISA. IgM production was negligible. Parenteral immunized mice showed higher IgG avidity maturation, as compared to oral immunized mice. Fecal excretion of IgG, IgA and IgM was detected in stools of immunized animals, more intense in oral immunized mice. In cellular immunity studies, induced by antigen, with detection of cytokine production by quantitative real-time PCR, there are a great production of IFN- γ by spleen cells, with lower levels in Peyer patches cells, where there are a greater IL-2 production. Challenge studies in immunized mice demonstrated protection to infection in all used schedules, greater in BALB/c mice. C57Bl/6j IFN- γ ^{-/-} mice, when immunized, showed no signs of disease and produced similar or greater levels of antibodies than wild type mice. They also excreted S-IgA and S-IgM in stools, but with low numbers of brain cysts in parenteral immunized mice, despite similar mortality. Our data points to a fair possibility of use of those irradiated parasites as an oral vaccine, devised to use for veterinary or wild felines vaccination, reducing the production of oocysts by those hosts and interrupting the chain transmission of human toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, ionizing radiation, mucosal immunity, vaccine



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174



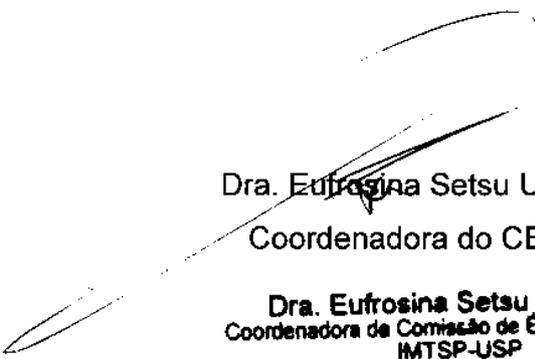
São Paulo, 08 de maio de 2008.

Ilmo (a)

Sr (a) Andrés Jimenez Galisteo

Em reunião na presente data, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CE-IMT/005/29042008** e intitulado "Toxoplasma gondii vs radiação ionizante: imunidade humoral, celular e produção de interleucinas intestinais em camundongos protegidos com taquizoítos irradiados.", sob a responsabilidade do Dr. Heitor Franco de Andrade Junior.

Atenciosamente


Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

Coordenadora do CEP-IMT

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS¹

γ	gama
⁶⁰ Co	Cobalto-60
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
<i>g</i>	RCF (<i>relative centrifugal force</i>)
Gy	Gray (dose de radiação)
H ₂ O ₂	Água oxigenada 30%
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
i.p	Inóculo parenteral
IFN- γ ^{-/-}	Camundongo geneticamente deficiente de IFN- γ
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
° C	graus Celsius
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Inibidor de proteases (phenylmethanesulfonyl fluoride)
Real-time PCR	Reação em cadeia pela polymerase em tempo real (<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>)
Th	Linfócito T helper
v.o	Inóculo oral
v/v	Volume a volume
β -actina	Proteína constitutiva de camundongo
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros

¹ Devido ao uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia em inglês.

SUMÁRIO

	Página
I INTRODUÇÃO	01
1.1 Radiação ionizante.....	01
1.1.1 Conceitos Gerais.....	01
1.1.2 Radiação em parasitoses.....	03
1.2 Toxoplasmose.....	06
1.2.1 Histórico.....	06
1.2.2 Ciclo de vida.....	07
1.2.3 Toxoplasmose em humanos e aspectos epidemiológicos.....	10
1.2.4. Toxoplasmose em animais.....	14
1.3 Imunidade na toxoplasmose.....	15
1.3.1 Sistema imune das mucosas na toxoplasmose.....	18
1.4 Vacinas para toxoplasmose.....	21
II OBJETIVOS	24
III MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Parasitas.....	26
3.1.1 Cepas RH (<i>virulenta</i>).....	26
3.1.2 Cepas ME49 (<i>cistogênica</i>).....	27
3.2 Animais experimentais.....	27
3.3 Irradiação dos taquizoítos de <i>T. gondii</i>	28
3.4 Imunização dos animais.....	29
3.5 Obtenção do antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	29
3.6 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal.....	30
3.7 Obtenção das amostras de soro dos animais imunizados.....	31
3.8 Detecção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro dos animais imunizados, por ELISA.....	31
3.9 Determinação das subclasses de IgG em camundongos C57Bl/6j e BALB/c.....	32
3.10 Obtenção da suspensão fecal dos animais imunizados.....	32
3.11 Detecção de anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas suspensões fecais, por ELISA.....	33

3.12 Avaliação da expressão relativa de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos e células intestinais de animais imunizados, por <i>real-time</i> PCR.....	34
3.12.1 Obtenção dos esplenócitos e células intestinais.....	34
3.12.2 Extração e quantificação de RNA.....	35
3.12.3 Síntese de cDNA.....	35
3.12.4 Confeção dos primers e eficiência de detecção.....	35
3.12.5 Condições da reação e análise dos resultados.....	36
3.13 Desafio dos animais imunizados e quantificação do número de cistos.....	37
3.14 Análise estatística.....	38
IV RESULTADOS.....	39
4.1 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados de <i>T. gondii</i>	39
4.2 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com taquizoítos de <i>T. gondii</i> irradiados a 255Gy.....	42
4.3 Determinação das subclasses de imunoglobulina G.....	43
4.4 Avidéz no soro após imunização.....	45
4.5 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com parasitas irradiados a 255Gy.....	46
4.6 Quantificações relativas por <i>real-time</i> PCR, das citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10), em esplenócitos e células intestinais, de camundongos imunizados com taquizoítos de <i>T. gondii</i> irradiados.....	47
4.7 Desafio com cistos da cepa ME49 dos animais imunizados com taquizoítos irradiados.....	51
4.8 Imunização e desafio dos animais geneticamente deficientes de IFN- γ ...	52
4.9 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos IFN- γ ^{-/-} , imunizados com parasitas irradiados a 255Gy.....	54
4.10 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos IFN- γ ^{-/-} , imunizados com parasitas irradiados a 255Gy.....	55
4.11 Desafio com cistos da cepa ME-49 dos animais IFN- γ ^{-/-} imunizados com taquizoítos irradiados.....	56

V DISCUSSÃO.....	58
VI CONCLUSÕES.....	74
VII REFERÊNCIAS.....	76
VII ANEXOS.....	100

ANEXOS

Anexo 1 - Produção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 2 - Excreção de anticorpos IgG, IgA e IgM, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 3 - Produção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 4 - Excreção de anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 5 - Variação da expressão gênica de citocinas esplênicas por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy.

Anexo 6 - Variação da expressão gênica de citocinas intestinais por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy.

Produção científica no período

Anexo 7: Meireles, L.R.; Tsutsui, V.S.; Carmo, C.V.; Galisteo JR, A.J.; Hiramoto, R.M.; Terentowicz, H.C.K. & de Andrade JR, H.F. Quantitative *Toxoplasma gondii* oocyst detection by a modified Kato Katz test using Kinyoun staining (KKK) in ME49 strain experimentally infected cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 50:** 187-190, 2008.

Anexo 8: Leal, F.; Cavazzana, C.L.; de Andrade JR, H. F.; Galisteo JR, A.J.; Mendonça, J.S. & Kallas, E.G. *Toxoplasma gondii* Pneumonia in Immunocompetent Subjects: Case Report and Review. **Clinical Infectious Diseases, 44:** e62-e66, 2007.

- Anexo 9:** Meireles, L.R.; Galisteo JR, A.J.; Pompeu, E. & de Andrade JR, H. F. Environmental *Toxoplasma gondii* spreading in urban area evaluated by seroprevalence in free living cats and dogs. *TM & IH. Tropical Medicine and International Health*, **9(8)**: 876-881, 2004.
- Anexo 10:** Galisteo JR, A.J.; Zorgi, N.E.; Alves, J.B.; Hiramoto, R. M.; Nascimento, N. & de Andrade JR, H. F. Humoral immune response of C57BL/6J and BALB/c mice immunized with irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* RH strain and oral challenge with ME-49 strain. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2007), 2007, Santos.
- Anexo 11:** Alves, J.B.; Vieira, D. P.; Galisteo JR, A.J.; Miyagui, C.Y.; Caproni, P.; Casare, M.S.; Spencer, P.J. & Nascimento, N. Structure alteration and immunological properties of Bothropstoxin-I irradiated with 60Co gamma rays. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2007), Santos.
- Anexo 12:** Galisteo JR, A.J.; Hiramoto, R.M.; Carmo, C. V.; Alves, J.B. & de Andrade JR, H.F. 255Gy irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* induce intestinal immune response in C57BL/6J mice immunized by oral route. In: The International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2005), Santos.
- Anexo 13:** 15º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- Anexo 14:** XXXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXIII Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2007.
- Anexo 15:** XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2006.
- Anexo 16:** XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2006.
- Anexo 17:** XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e o I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005.
- Anexo 18:** XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e o I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005.
- Anexo 19:** XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology & XXXII Annual Meeting on basic Research in Chagas Disease, 2005.
- Anexo 20:** XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology & XXXII Annual Meeting on basic Research in Chagas Disease, 2005.
- Anexo 21:** XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

Anexo 22: XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

Anexo 23: XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

Anexo 24: XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

Anexo 25: XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

Anexo 26: XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

I – INTRODUÇÃO

1.1 Radiação ionizante

1.1.1 Conceitos Gerais

As radiações são ondas eletromagnéticas ou partículas que se propagam com determinada velocidade, contém energia e carga elétrica. Podem ser geradas por fontes naturais ou artificiais criadas pelo homem. As radiações eletromagnéticas podem ser divididas em dois grupos, as não ionizantes (ondas de rádio e televisão, telefonia móvel e microondas) e ionizantes, as quais são subdivididas em corpusculares (α , β , nêutrons, elétrons e prótons) e as eletromagnéticas como os raios X e radiação gama.

A radiação ionizante além de muito empregada na esterilização de alimentos e produtos hospitalares, também apresenta um grande potencial de utilização na produção de vacinas (WALES & KUSEL, 1992), pelo fato de produzir danos diretos ou indiretos sobre as moléculas reprodutoras dos seres vivos. Esse tipo de radiação apresenta alta energia e capacidade de promover ionização e excitação nos meios, possuindo um alto poder de penetração (GROSH & HOOPYWOOD, 1979).

O possível uso da radiação como uma tecnologia capaz de criar imunógenos potencialmente úteis como vacinas é descrita desde os anos 50 (TAYLOR *et al.*, 1986). Tanto a radiação gama, os raios-X e a radiação ultravioleta têm sido convincentemente úteis na atenuação ou esterilização de agentes biológicos dos mais variados tipos. Em todos os modelos celulares estudados, a radiação promove

essencialmente a perda da capacidade reprodutiva, mantendo o potencial imunogênico adequado (WALES & KUSEL, 1992).

A radiação gama age por duas vias, na ação direta que decorre da transferência da energia para a molécula alvo, provocando ionização e modificação da estrutura química, gerando alteração na função biológica. Indiretamente e mais freqüentemente, a radiação age pela interação com a água do meio, molécula mais encontrada nos sistemas biológicos, formando hidrogênio molecular (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e vários radicais livres, como hidroxila (OH^\bullet), elétron aquoso (e^-_{aq}), átomo de hidrogênio (H^\bullet) e peroxila (HO_2^\bullet). Estes radicais interagem com moléculas biológicas, afetando estruturas celulares e ampliando os efeitos da radiação, devido ao seu potencial oxidante. (MICHAELS & HUNT, 1978).

Os ácidos nucléicos e as proteínas são as principais moléculas afetadas, no entanto a atividade enzimática das proteínas e lipídeos de membrana celular somente podem ser alterados com doses mais elevadas de radiação (BUTLER *et al.*, 1984). A radiosensibilidade depende da linhagem celular, e da capacidade de reparo dos danos provocados no DNA, que, quando irreversíveis, podem levar a morte celular. Esse fenômeno pode ser imediato, tanto por agressão a genes essenciais (SZUMIEL, 1994), como por indução de apoptose, via radical, em grupos celulares específicos (HAIMOVITZ-FRIEDMAN, 1998). No entanto, o dano mais freqüente só será evidenciado na próxima divisão celular, pela perda do contato das cromátides irmãs com o fuso mitótico (OKAZAKI, 1995).

Além da ação sobre os processos reprodutivos dos agentes ou indução de morte fisiológica, alguns fenômenos relacionados a alterações de proteínas induzidas pela ação direta da radiação ou através de radicais produzidos durante a radiólise da água são sugestivos de uma melhor resposta imunológica (PINHO *et al.*,

1995). Tal fato provavelmente decorre da oxidação das proteínas, levando a uma fagocitose preferencial por células imunes, através de receptores *scavenger* (CARDI *et al.*, 1998), sendo uma importante ferramenta para a produção de imunógenos.

Estudos com proteínas de venenos de serpentes, submetidas à ação da radiação gama, vêm demonstrando a eficiência do método como ferramenta na produção e melhora na qualidade de imunógenos, somado a vantagem de não adicionar novas moléculas a amostra durante o processo, como no caso do uso de agentes físicos ou químicos e à melhoria da antigenicidade de muitas proteínas (BAPTISTA *et al.*, 2006).

1.1.2 Radiação em parasitoses

Usualmente, a radiação é usada em altas doses apenas para esterilização de alimentos contaminados, porém vem sendo utilizada como ferramenta na tentativa de produção de imunógenos, contra diversas doenças parasitárias (ERICKSON & ORTEGA, 2006).

Candidatos vacinais utilizando parasitas irradiados já foram utilizados com bons resultados para helmintos (WALES & KUSEL, 1992). Ovos e miracídios de *Schistosoma mansoni*, foram isolados e irradiados com Cobalto-60 com doses de 5 a 2000 Gy, tanto os ovos irradiados como os miracídios nas doses de 10 a 500 Gy, não conseguiram se desenvolver, porém quando foi utilizada a dose de 5 Gy, 3,2% dos caramujos desenvolveram a infecção (ANTUNES *et al.*, 1971). Quando camundongos são imunizados com cercárias irradiadas (150 a 200 Gy), ocorre uma diminuição na carga de vermes de uma infecção desafio em até 90%, quando comparados com grupos não vacinados (RICHTER *et al.*, 1995).

Em protozoários, ao estudar o efeito da radiação, na dose de 200 Gy, em esporozoítos de *Eimeria tenella* (Protozoa;Coccidia), notou-se danos nos mecanismos nucleares e celulares de reprodução, resultando em esterilização do agente (GILBERT *et al.*, 1998).

Em outros modelos como *Trypanosoma cruzi*, a radiação apenas induziu a perda de infectividade em um processo dose-dependente (MARTINEZ-SILVA *et al.*, 1969). Entretanto, outros autores observaram que não houve proteção quando camundongos, que receberam parasitas irradiados, eram inoculados com formas sangüíneas virulentas não irradiadas (SALATA *et al.*, 1973). Camundongos imunizados com 1×10^8 formas/animal (3 doses) de *T. cruzi* irradiados com ^{60}Co , foram desafiados com 1×10^2 parasitas metacíclicos isolados de *Triatoma infestans* e em todos os animais houve uma diminuição da parasitemia (OKANLA *et al.*, 1982). Outro estudo realizado em bovinos, utilizando *Trypanosoma brucei*, demonstrou que esse animais imunizados com 10^7 formas dos parasitas irradiados a 600 Gy (^{137}Cs), conferiram proteção completa contra desafio com 10^3 parasitas não irradiados (MORRISON *et al.*, 1982).

Em plasmódios, parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, a imunização de voluntários humanos, com esporozoítos irradiados, induziu proteção parcial contra a infecção, mas sem proteção contra desafio com formas eritrocíticas (NUSSENZWEIG *et al.*, 1969). Esporozoítos de *Plasmodium berghei*, irradiados e criopreservados, foram inoculados em camundongos e apresentaram altos índices de proteção quando desafiados com as mesmas formas não irradiadas (ORJIH & NUSSENZWEIG, 1980). Foi possível observar também que esporozoítos irradiados foram capazes de invadir hepatócitos e se transformar em trofozoítos, mas com degeneração após essa fase, gerando imunidade semelhante à doença natural no

hospedeiro (SCHELLER *et al.*, 1995). Quando voluntários humanos foram submetidos a imunizações com esporozoítos de *P. falciparum* irradiados a 150 Gy, desenvolveram anticorpos e foram protegidos contra malária transmitida através de mosquitos (EGAN *et al.*, 1993).

Em *Toxoplasma gondii*, a radiação foi empregada inicialmente com o objetivo de eliminar a infectividade de cistos em carnes contaminadas (DUBEY *et al.*, 1986), ou formas infectantes como oocistos (DUBEY *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 1996a) em alimentos contaminados, porém, quando taquizoítos foram submetidos a doses de 200 Gy, foi observado que os taquizoítos irradiados promovem uma resposta de anticorpos similar a dos animais tratados, demonstrando que os parasitas irradiados nessa dose preservam suas características, além de inibir completamente a reprodução, sem danificar os processos de invasão celular e seu metabolismo basal, fornecendo em animais uma imunidade semelhante a infecção natural (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

Utilizando preparações de taquizoítos irradiados por via oral, foi observada a produção de imunoglobulinas IgG e IgA no soro de camundongos C57Bl/6j, similar a infecção crônica. Seu uso com adjuvantes anti-ácidos induziu produção de IgA fecal e menos significativamente de IgG fecal. Outro fato importante observado foi que as preparações orais induziram proteção quantitativa ao desafio dos animais imunizados por cepa cistogênica, que foi semelhante à imunização parenteral, quando o hidróxido de alumínio foi usado como adjuvante (GALISTEO JR. *et al.*, 2005). Todos estes dados demonstram o potencial uso da radiação ionizante no desenvolvimento de uma vacina para toxoplasmose, para uso em animais e principalmente em felinos domésticos e selvagens.

1.2 Toxoplasmose

1.2.1 Histórico

A toxoplasmose é uma doença de ocorrência mundial causada pelo protozoário *Toxoplasma gondi* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908). Este parasita se destaca por possuir uma estrutura própria ao filo chamada Complexo Apical, sendo esta responsável pela invasão nas células dos hospedeiros. O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, capaz de invadir e se multiplicar no interior de qualquer célula nucleada, sem distinção de tipo tecidual. A infecção se caracteriza na maior parte dos casos por uma fase inicial aguda de intensa replicação do parasita, seguida de uma fase crônica, assintomática em que o parasita se reproduz lentamente (DUBEY *et al.*, 1998a).

Este parasita foi descoberto independentemente e simultaneamente, em coelhos de laboratório no Brasil (SPLENDORE, 1908) e em roedores *Ctenodactylus gundi* na Tunísia (NICOLLE & MANCEAUX, 1908). Em 1912, durante o I Congresso de Patologia Comparada em Paris, Splendore dissertando sobre a toxoplasmose em coelhos predisse: “[...] nós não devemos ficar surpresos se esta doença for observada em seres humanos no futuro. [...] isto é o que indica nossas pesquisas e observações.”

No início a toxoplasmose foi constantemente confundida com outras parasitoses e apenas em 1923 ocorreu à primeira caracterização de infecção em humanos, com a descrição de cistos oculares em uma criança de 11 meses com hidrocefalia em Praga (JANKU, 1923). Em 1954, devido à observação da alta prevalência da infecção na população, sugeriu-se que a transmissão ocorria através

da ingestão de carnes malcozidas, o que foi confirmado por outros pesquisadores, os quais demonstraram a resistência dos cistos teciduais às enzimas proteolíticas dos sucos digestivos (JACOBS, 1967). Porém não se conhecia a forma principal de transmissão. Estudos com modelos de *Toxocara* em gatos mostraram que o *T. gondii* poderia ser transportado pelos ovos do verme (HUTCHISON, 1965). Apenas alguns anos depois esse fato foi totalmente compreendido, podendo-se então, dissociar a transmissão da toxoplasmose do sistema de helminto (FRENKEL *et al.*, 1969; SHEFFIELD & MELTON, 1969), sendo o oocisto, forma encontrada nas fezes do gato e a elucidação da fase sexuada do agente muito bem caracterizada em seguida (DUBEY *et al.*, 1970; MILLER *et al.*, 1972).

1.2.2 Ciclo de vida

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 1), tendo os felinos como hospedeiros definitivos e o homem e os demais animais de sangue quente considerados hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 1998a). O protozoário invade as células do intestino delgado dos felinos onde ocorre o ciclo enteroepitelial, caracterizado por reprodução sexuada do parasita, liberando oocistos nas fezes (FRENKEL *et al.*, 1970). O felino infectado pode excretar milhões de oocistos por dia, nas fezes, por até 10 dias de excreção (MEIRELES *et al.*, 2008).

A esporulação dos oocistos ocorre no meio ambiente após aproximadamente cinco dias em contato com o solo e o oxigênio do ambiente, resultando na formação de dois esporocistos, com quatro esporozoítos em cada um (WONG & REMINGTON, 1993). Após a ingestão de oocistos esporulados por hospedeiros intermediários ou novamente por felinos, através de água ou alimentos

contaminados, são liberados os esporozoítos, que invadem as células intestinais e se transformam em taquizoítos, forma assexuada do parasita e de proliferação rápida, que serão disseminados pela circulação aos outros tecidos onde invadirão as células nucleadas, havendo proliferação e reativação (DUBEY *et al.*, 1998a).

Outras formas menos freqüentes da aquisição da doença são através de transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais, transfusão de sangue de indivíduos na fase aguda da infecção e através da transmissão congênita (WEISS & KIM, 2007), como pode ser observada no ciclo abaixo.

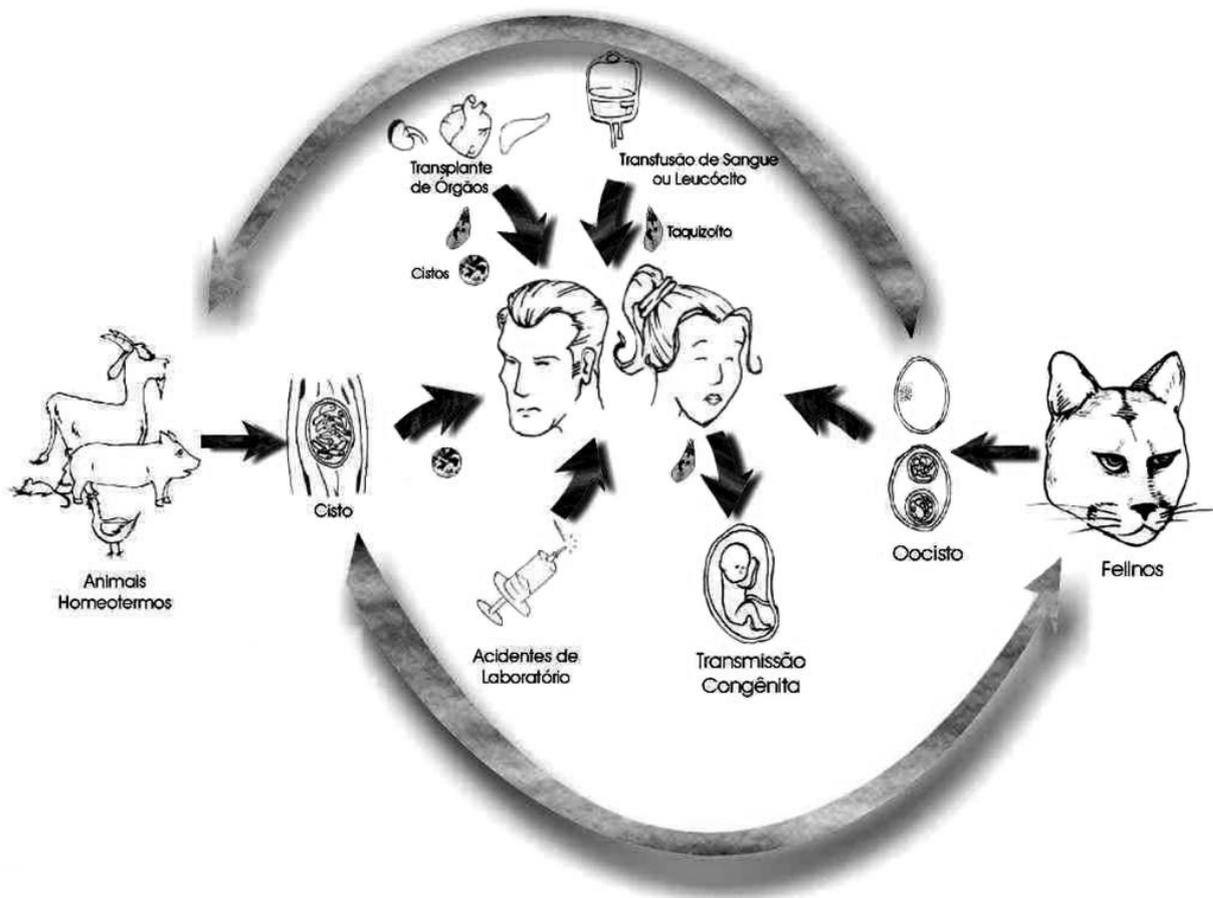


Figura 1 - Ciclo do *Toxoplasma gondii*, mostrando os hospedeiros definitivos (felinos), hospedeiros intermediários e suas várias vias de infecção (Foto: Andrés J. Galisteo Jr & Roberto M. Hiramoto; Desenhos: Rodrigo Righetto Jimenez).

Os taquizoítos apresentam diversas estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi e também apresentam organelas características do filo, complexo apical ou conóide, com anéis polares, roptrias e micronemas e grânulos densos. Estas formas de multiplicação rápida atingem o restante do corpo dos hospedeiros intermediários através do sangue e da linfa, multiplicando-se assexuadamente no interior das células por repetidas endodiogenias (WEISS & KIM, 2007).

As principais estruturas envolvidas na penetração são a superfície do agente e o complexo apical. Ao aderir-se à célula, através de receptores de superfície como SAG-1, o agente orienta seu complexo apical de forma a criar uma junção intracelular e formar na célula um vacúolo confortável para o agente (MAGNO *et al.*, 2005). Esta forma de invasão usa um mínimo de exposição de antígenos, o que dificulta o reconhecimento da resposta imune especialmente em vacinas com extrato total de baixa eficácia (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

Alguns taquizoítos, após a invasão da célula hospedeira desenvolvem-se mais lentamente transformando-se em bradizoítos, que preferencialmente vão formar cistos em células mais estáveis como no tecido cerebral, músculo esquelético e cardíaco (DUBEY *et al.*, 1998a).

Os cistos intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por longos períodos ou por toda a vida do hospedeiro sem causar a este nenhuma resposta inflamatória ou despertar resposta tecidual significativa (DUARTE & ANDRADE Jr., 2006). O destino dos cistos teciduais não é totalmente conhecido, mas se propõe que às vezes estes possam se romper durante a vida, liberando os bradizoítos que podem ser destruídos pelo sistema imune ou formar novos cistos (WEISS & KIM, 2007).

Estas formas ao serem ingeridas promovem uma nova infecção em uma via alternativa do ciclo, através da ingestão de carne crua e mal cozida, que contenha tais cistos (SIBLEY, 2003). A parede do cisto é dissolvida por enzimas digestivas e os bradizoítos liberados são capazes de penetrar nas células epiteliais do intestino, disseminando-se por todo o indivíduo no caso dos hospedeiros intermediários. Porém no caso dos hospedeiros definitivos ocorre a formação de oocistos que são excretados nas fezes contaminando assim o ambiente e outros animais (DUBEY, 1993).

1.2.3 Toxoplasmose em humanos e aspectos epidemiológicos

Em indivíduos imunocompetentes, a doença geralmente causa perturbações leves e temporárias, a toxoplasmose é uma infecção muito prevalente em inúmeras regiões do mundo com importância médica (REMINGTON *et al.*, 2005). A doença é geralmente controlada pela resposta imune do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, porém em alguns casos pode ocorrer o comprometimento ocular (ROBERTS & McLEOD, 1999). Esse comprometimento pode ser adquirido tanto na infecção congênita como na infecção adquirida após o nascimento (GLASNER *et al.*, 1992).

Em países como os EUA, a retinocoroidite é responsável por 30-50% de todos os casos de danos visuais (McCANNEL *et al.*, 1996). No Brasil, em estudo realizado na cidade de Erechin, 17,7% das pessoas examinadas apresentaram lesões oculares, sendo que a maioria dos casos foi detectada em indivíduos adultos, mostrando que a toxoplasmose ocular pode ser considerada uma seqüela da infecção aguda adquirida (GLASNER *et al.*, 1992).

Outro estudo realizado na cidade de Jaguapitã, no estado do Paraná, 82,9% dos indivíduos examinados apresentou positividade contra o *T. gondii*, e destes, 26,8% tiveram algum tipo de lesão ocular (GARCIA *et al.*, 1999). No estado do Rio de Janeiro, em Campos de Goytacazes, a prevalência de toxoplasmose ocular na área rural foi de 14% e na área urbana 8% (PETERSEN *et al.*, 2001).

Na comunidade indígena multiétnica em Iauareté, situada na bacia do Alto Rio Negro, a prevalência da reatividade foi de 73,5% da população mais jovem, aumentando com a faixa etária e atingindo 95,7% em indivíduos maiores de 50 anos (BÓIA *et al.*, 2008).

Um importante grupo afetado pela toxoplasmose é a de gestantes que nunca tiveram contato com o parasita e passam a adquirir a infecção durante a gestação, podendo através da transmissão transplacentária, ocasionar graves lesões ao feto (SABIN, 1941). A maioria dos recém nascidos infectados não apresenta sinais clínicos ao nascer, mas são freqüentes seqüelas da infecção congênita no decorrer da vida como coriorretinite, causando grave lesão ocular, a qual poderá culminar em cegueira, em casos extremos, além de epilepsia ou deficiência mental leve (REMINGTON *et al.*, 2005).

Nos EUA, ocorre cerca de 400 a 4000 casos por ano, acarretando enormes gastos com serviços médicos e uma queda na produtividade atribuível a toxoplasmose (HSU *et al.*, 1992; ROBERTS & FRENKEL, 1990). Em países da Europa como França e Áustria, estima-se que a cada 1000 nascimentos ocorram 3-4 casos de transmissão congênita da toxoplasmose (GRAS *et al.*, 2005).

No estado do Rio grande do Sul, foram analisados 140.914 recém nascidos, sendo possível determinar uma prevalência de 1 para cada 3000 nascidos vivos (NETO *et al.*, 2000). Em Campos de Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro, as

estatísticas são ainda maiores, sendo detectados 5 casos de toxoplasmose congênita para cada 2550 recém nascidos (PETERSEN *et al.*, 2001).

No estado de São Paulo (região metropolitana), estima-se que devam nascer cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano, cerca de uma a cada 1000 partos (GUIMARÃES *et al.*, 1993). Recentemente em um grupo de estudantes de uma escola em Jataizinho, no Paraná, 46.4% das crianças analisadas apresentaram positividade contra o *T. gondii* e estudos epidemiológicos associaram esses índices elevados à presença de gatos dentro do convívio familiar (LOPES *et al.*, 2008).

A toxoplasmose também pode afetar o grupo das pessoas que apresentam uma queda do sistema imunológico, como os portadores de HIV, os transplantados e os indivíduos em tratamento contra o câncer.

Em pacientes com AIDS, o parasita é responsável pelo desenvolvimento de uma variedade de sintomas, mas o mais freqüente é a encefalite, onde a rápida multiplicação dos taquizoítos resulta na destruição dos tecidos neurais. Nestes pacientes, um aspecto importante é a possível reativação da infecção devido aos cistos latentes, causada pela liberação de bradizoítos, que se transformam em taquizoítos provocando doença grave, principalmente lesões cerebrais (LUFT & REMINGTON, 1992).

Em países como a África, 50% dos indivíduos com AIDS desenvolvem encefalite devido à toxoplasmose (CLUMECK *et al.*, 1984). Nos EUA, dos pacientes com AIDS, cerca de 18 a 25% podem desenvolver toxoplasmose e apresentar alguma seqüela (KASPER & BUZONI-GATEL, 1998), gerando um gasto estimado de 23 a 106 milhões de dólares por ano em tratamento (ROBERTS *et al.*, 1994).

Em São Paulo, um levantamento realizado em 1988 e 1991 apresentou respectivamente 21% e 46% de encefalite por toxoplasma em pacientes com AIDS

(PASSOS *et al.*, 2000), sendo que a toxoplasmose é uma das principais causas associadas em mortes por AIDS, responsável por 12,2% dos óbitos (SANTOS *et al.*, 2000).

Pessoas que sofreram transplante de fígado, coração e medula óssea, também podem adquirir a toxoplasmose, podendo causar sérios problemas, inclusive levando a óbito (MAYES *et al.*, 1995). Na Europa, vários casos de pacientes que sofreram transplantes de células hematopoiéticas, apresentaram severas lesões e óbito (MARTINO *et al.*, 2000), em outro estudo com 655 pacientes que sofreram transplante de medula óssea, 24 pacientes apresentaram encefalite, dos quais 74% foram devido a toxoplasmose (MASCHKE *et al.*, 1999). No Brasil, no período de 1996 a 1998, de 97 transplantados cardíacos, quatro casos apresentaram infecção por *T. gondii*. (COUTO *et al.*, 2001).

A toxoplasmose também tem sido freqüentemente descrita em pacientes com câncer que estão sofrendo tratamento com quimioterápicos, onde se tem observado o aparecimento de coriorretinite associada com encefalite, bem como complicações em outros órgãos (DAGHER & LUCAS, 1996; ISRAELSKI & REMINGTON, 1993).

Além de todos os comprometimentos envolvidos na toxoplasmose, outros fatores devem ser levados em conta e se confirmados poderão representar um grande problema de saúde pública. Alguns grupos estudando comportamento animal (WEBSTER, 2007; HRDÁ *et al.*, 2000) e outros estudando comportamento humano (FLEGR *et al.*, 2007; LINDOVÁ *et al.*, 2006), notaram que os grupos infectados cronicamente pelo *T. gondii* podem apresentar modificações comportamentais, como alterações no superego e redução da performance psicomotora.

1.2.4 Toxoplasmose em animais

Recentemente demonstramos que em animais destinados ao consumo humano no Brasil, 9,6% dos suínos (SUARÉZ-ARANDA *et al.*, 2000), 11% dos bovinos, 17% dos caprinos e 31% dos ovinos (MEIRELES, 2001), apresentaram positividade para o *T. gondii*.

Especificamente na região metropolitana, gatos apresentaram 40% e cães errantes 50,5% de positividade para o *T. gondii*. Cães errantes apresentam um potencial importante na detecção da prevalência da toxoplasmose, pois podem ser considerados como sentinelas ambientais (MEIRELES, 2004).

Em outros países também são encontrados altos níveis de infecção como 30,9% em suínos da Holanda (VAN KNAPEN *et al.*, 1995) e 38,5% em ovinos no Uruguai (FREYRE *et al.*, 1999), o que demonstra a importância do consumo de carne como uma das fontes de contaminação humana, caso não haja cocção adequada do alimento (DUBEY, 1996b). Vários fatores estão envolvidos nas diferenças de positivities entre as espécies e regiões estudadas, mas o principal fator está relacionado com a forma de criação e alimentação fornecida durante a criação dos animais (SUARÉZ-ARANDA *et al.*, 2000).

Outra fonte possível e importante de contaminação é o leite e seus derivados, onde os parasitas de *T. gondii* permanecem viáveis por 20 dias no leite a 4°C e resistindo inclusive aos processos de manufatura do queijo, permanecendo viáveis por um período de 10 dias nas mesmas condições (HIRAMOTO *et al.*, 2001).

Os animais destinados ao consumo humano quando atingidos pela toxoplasmose, além de servirem como fontes de contaminação, também representam prejuízos econômicos aos seus criadores, devido a abortos e mortes

neonatais (BUXTON, 1998). Estima-se no Uruguai perda de 1,4-3,9% dos ovinos em fase gestacional, com um prejuízo em torno de US\$ 1,4-4,7 milhões de dólares (FREYRE *et al.*, 1999).

1.3 Imunidade na toxoplasmose

Os mecanismos de defesa do hospedeiro exercem um papel crucial no controle da atividade do *T. gondii*. Na fase inicial da infecção ocorre o processo de reconhecimento antigênico e ativação do sistema de defesa específica. O amadurecimento da resposta imunológica específica inibe eficientemente a replicação do *T. gondii*, porém não é capaz de destruí-lo. O parasita por sua vez apresenta mecanismos de escape do sistema imune, assumindo uma forma de baixa imunogenicidade formando cistos em tecidos, os quais se mantêm viáveis por toda a vida do hospedeiro (LANG *et al.*, 2006).

O papel das células B na infecção pelo *T. gondii*, não é totalmente esclarecida. A resistência à infecção está associada a um aumento na produção de anticorpos específicos, principalmente da subclasse IgG2a em camundongos. Os anticorpos persistem durante a vida do hospedeiro, mas seu papel permanece controverso, devido ao caráter intracelular do *T. gondii*. *In vitro*, anticorpos contra proteínas específicas (SAG1, GRA2 e GRA6), demonstraram ser eficientes no bloqueio da invasão dos parasitas (CHA *et al.*, 2001), sendo que o mesmo efeito não foi observado *in vivo*, através da transferência passiva de anticorpos específicos, demonstrando a pouca eficiência protetora dos anticorpos, nos modelos estudados (PAVIA, 1986). Em modelos recentes, utilizando camundongos deficientes em células B, mas produtores de IFN- γ , foi possível observar um aumento na

sensibilidade a infecção aguda em relação aos animais selvagem (KANG *et al.* 2000). Neste mesmo modelo a transferência de linfócitos B sensibilizados (CHEN *et al.*, 2003a) ou anticorpos específicos (KANG *et al.*, 2000) restaurou a resistência a infecção.

O controle da infecção pelo *T. gondii* também é mediado por células, onde a ativação dessa defesa está relacionada com tipos celulares especializados que interagem entre si através da expressão de antígenos de superfície, de mediadores específicos (citocinas) e sua interação com receptores específicos. Desta maneira, a avaliação do perfil das citocinas produzidas durante a infecção, fornece evidências a respeito do grau e forma de ativação da imunidade celular.

Diferentes perfis na produção de citocinas são observados durante distintas formas de infecção, resultando em diferentes respostas efetoras. A partir deste comportamento, padronizou-se um conceito de paradigma das respostas do tipo Th1 e Th2. A resposta do tipo Th1 envolve células T helper e citotóxicas mediadas por citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α que são produzidas por infecções intracelulares. Já a resposta do tipo Th2, com produção preferencial de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, é dirigida a infecções extracelulares. As respostas Th1 e Th2 são contrabalanceadas por mecanismos de inibição, desta forma, citocinas Th1 inibem a expressão de citocinas Th2 e a ausência da estimulação Th1 levaria a produção da resposta Th2 (JANKOVIC *et al.*, 2001; SZABO *et al.*, 2003).

Na toxoplasmose, a principal citocina envolvida na resistência da infecção é o IFN- γ , o que demonstra ser uma resposta preferencialmente voltada para o tipo Th1. Sua produção é realizada por células T CD4+ e NK, sendo principalmente regulada pela produção de IL-12. Esta citocina é responsável pelo aumento da capacidade fagocítica contra o *T. gondii*, aumento da expressão de MHC classe II em células T e

também tem um importante papel na indução da conversão de taquizoítos para bradizoítos (BOHNE, *et al.*, 1993). Esse efeito protetor do IFN- γ , apresenta mecanismos regulatórios ainda desconhecidos, porém sabe-se que linhagens de camundongos suscetíveis e resistentes à toxoplasmose, apresentam níveis séricos diferentes, sendo mais elevados em animais suscetíveis (McLEOD *et al.*, 1989). Concentrações mais exacerbadas de IFN- γ estão relacionadas com infecções letais causadas por isolados de *T. gondii* altamente virulentos (MORDUE *et al.*, 2001).

Dentre as citocinas regulatórias a IL-10 é uma das citocinas mais importantes envolvidas no controle do efeito Th1 durante a toxoplasmose aguda (GADDI & YAP, 2007). Sabe-se que a IL-10 tem papel inibitório sobre outras citocinas como: IL-2, IFN- γ e TNF- α , inibindo a resposta Th1, por supressão da IL-12 (O'GARRA & VIEIRA, 2007). Além das citocinas já descritas, outras podem participar da resposta imune contra o *T. gondii*, como IL-1, IL-2, GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos), IL-4 e IL-5 (BEAMAN *et al.*, 1992).

IL-4 é uma citocina principalmente produzida por linfócitos Th2, e em menor por basófilos e mastócitos. Seu principal papel é a diferenciação de células T para o perfil Th2, bem como proliferação de linfócitos B. O seu papel é desfavorável durante a fase aguda da infecção, onde na ausência de IL-4, ocorre uma maior sobrevivência dos animais infectados e diminuição de lesões intestinais (NICKDEL *et al.*, 2004). O papel da IL-4 é muito dependente do modelo usado, incluindo as linhagens de camundongos naturalmente resistentes ou suscetíveis a infecção e grau de virulência da cepa do parasita utilizada.

1.3.1 Sistema imune das mucosas na toxoplasmose

Os avanços feitos na área do estudo e o entendimento do sistema imunológico das mucosas nos últimos anos tem sido de extrema importância para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelo equilíbrio e relação entre saúde e doença. A mucosa intestinal possui particularidades muito interessantes do ponto de vista imunológico, onde, além das estratégias de defesa à entrada de patógenos, também apresenta um papel importante no reconhecimento e conseqüentemente na tolerância às proteínas alimentares e a microorganismos da flora comensal.

O sistema imune de mucosas ou MALT (mucosa-associated lymphoid tissues) contribui com cerca de 80% de todas as células imunes, formando o maior sistema linfóide mamífero (HOLMGREN & CZERKINSKY, 2005). É composto de agregados de linfócitos, macrófagos, e outras células acessórias localizadas abaixo do epitélio mucoso, bem como linfócitos intra-epiteliais difusamente espalhados (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000). As placas de Peyer são agregados anatomicamente definidos de tecido linfóide associado à mucosa, na lâmina própria do intestino delgado. O epitélio intestinal ao redor das placas de Peyer é especializado de modo a permitir o transporte de antígenos para o tecido linfóide e esta função é realizada por células epiteliais, denominadas células M. Essas últimas são capazes de capturar e internalizar antígenos, permitindo posteriormente, que células apresentadores de antígenos, processe esse material e apresente às células linfóides subepiteliais, desenvolvendo uma resposta imune local (BRAYDEN *et al.*, 2005).

A necessidade de permeabilidade da superfície das mucosas cria uma vulnerabilidade a certas doenças e sua importância como principal via de entrada,

ainda não é totalmente entendida. As células intestinais entram em contato com o parasita durante a penetração intestinal e fornecem a primeira linha de defesa contra a invasão, envolvendo mecanismos celulares e humorais (KASPER *et al.*, 2004). Toda a caracterização das estruturas e a dinâmica de invasão pode ser observada na Figura 2.

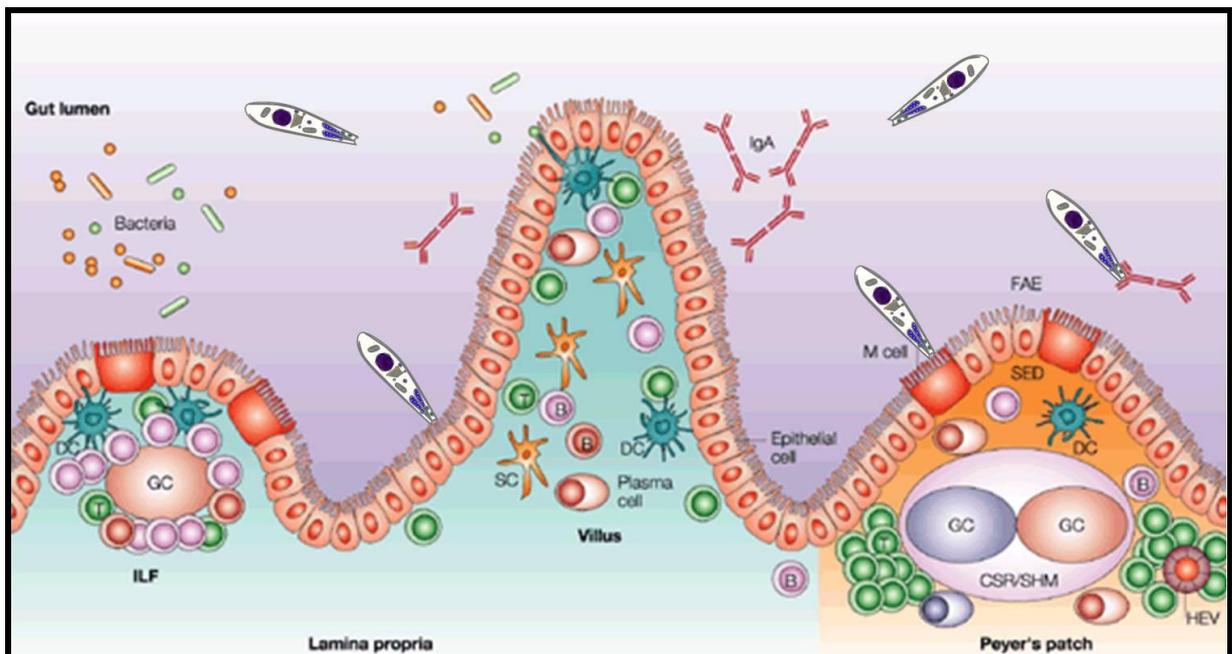


Figura 2 – Representação esquemática da mucosa intestinal e as vias de invasão do *T. gondii*. GC - Centro germinativo; DC - Células dendríticas; FAE – Epitélio associado ao folículo (Foto: FAGARASAN & HONJO, 2003, modificado por Andrés Jimenez Galisteo Jr.)

A infecção pelo *T. gondii* é iniciada pela invasão dos enterócitos pelo parasita após a ingestão de cistos ou oocistos. A resposta inflamatória começa localmente na mucosa intestinal sendo, em seguida, disseminada por todo o corpo do hospedeiro. A infecção dos enterócitos pelo parasita desencadeia a produção das quimiocinas MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 e RANTES que rapidamente recrutam células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, células T, NK e células dendríticas para

os sítios de infecção (DENKERS *et al.*, 2004; KASPER *et al.*, 2004). As células inflamatórias ativadas passam a secretar citocinas, que ampliam o recrutamento celular e produzem também citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12). As células inflamatórias, ativadas pelo IFN- γ e TNF- α , empenham na toxoplasmose, um controle na replicação parasitária (SIBLEY *et al.*, 1991), Muitos mecanismos para esse controle são descritos, como mecanismos oxidativos (MURRAY & COHN, 1979), produção de nitratos que interferem em enzimas metabólicas essenciais do parasita (SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1997), ativação de indoleamina 2,3 deoxigenase, responsável pela degradação do triptofano e essencial para a sobrevivência do parasita (SILVA *et al.*, 2002) e produção de proteínas GTP, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido (COLLAZO *et al.*, 2001).

Evolutivamente a mucosa intestinal se adaptou também com outros mecanismos muito particulares, como o peristaltismo, produção de muco e produção de anticorpos específicos que são liberados na luz intestinal. A imunoglobulina associada com o sistema de mucosas é a IgA secretora (S-IgA). No sangue, a IgA aparece como monômero, enquanto que nas mucosas ela é principalmente um dímero. IgA secretora gerada por transporte mediado por p-IgR (receptor de Ig polimérica) que bloqueia a adesão de microorganismos na mucosa, sendo a primeira linha no reconhecimento e defesa contra os patógenos (WEINER, 2001).

A infecção pelo *T. gondii* provoca um aumento na produção de anticorpos específicos, preferencialmente S-IgA contra o parasita no intestino. Ensaio demonstraram que essa imunoglobulina pode inibir a infecção de enterócitos *in vitro* (MACK & McLEOD, 1992). Os linfócitos intra-epiteliais (IEL) do intestino participam da resposta imune através da liberação de várias citocinas como IL-2, IL-3, IL-5, TNF- α e IFN- γ . A transferência de IEL (CD8⁺) de camundongos infectados protege

animais desafiados por via oral, prevenindo a infecção aguda e a mortalidade (BUZONI-GATEL *et al.*, 1997) e induzindo proteção por longos períodos (LEPAGE *et al.*, 1998).

Como podemos notar, a principal via de acesso de inúmeros parasita é a via oral, portanto o epitélio intestinal, ao mesmo tempo em que serve como porta de entrada, deve promover uma barreira fisiológica e imunológica contra microrganismos e substâncias estranhas, sendo o principal local de defesa do organismo. Em geral, este sistema imune de mucosa é homeostático, apesar da considerável carga antigênica presente no intestino (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006).

1.4 Vacinas para toxoplasmose

Até o momento não existe nenhuma vacina comercial para a toxoplasmose humana, que previna a infecção congênita, ou a formação e reativação de cistos (GOTTSTEI, 1995). Foram testados diversos esquemas de imunização contra o *T. gondii* em animais, como antígenos isolados, parasitas inativados e cepas mutantes (ARAÚJO, 1994), porém os resultados obtidos não apresentaram níveis de proteção satisfatórios e até mesmo em alguns casos houve o comprometimento do sistema de defesa do agente.

Pelas dificuldades de crescimento do parasita, muitos grupos direcionaram seus estudos para o desenvolvimento de uma vacina utilizando proteínas recombinantes. Tentativas utilizando apenas uma proteína recombinante não apresentaram resultados divergentes, provavelmente pela limitação da ação dos anticorpos gerados por essas imunizações (VELGE-ROUSSEL *et al.*, 1994). Camundongos BALB/c, imunizados por via intranasal, com proteínas recombinantes

rROP2, rGRA5 e rGRA7, associadas com toxina colérica, apresentaram proteção parcial quando desafiados com cistos da cepa VEG (IGARASHI *et al.*, 2008). Experimentos utilizando SAG3 recombinante, na presença de Quil A, também apresentaram proteção parcial quando BALB/c imunizados foram desafiados com cepa ME49 (LEE *et al.*, 2007). Até o momento todas as tentativas de imunizações com proteínas híbridas não apresentaram resultados satisfatórios, sugerindo que a eficiência da imunização provavelmente esteja relacionada com uma apresentação mais semelhante dos antígenos do *T. gondii*.

Existe neste momento apenas uma única vacina comercial para uso em ovelhas (TOXOVAX[®]), que está disponível na Grã Bretanha e Nova Zelândia, e utiliza taquizoítos da cepa S-48, que não persistem nos tecidos dos animais, reduzindo a perda de fetos (BUXTON, 1993) e apresentando uma proteção de 70%, porém com uma enorme dificuldade na logística da entrega das unidades vacinais em localidades mais distantes.

A vacina ideal contra a toxoplasmose deve prevenir a infecção humana, e os alvos vacinais deverão ser os felinos, que são os responsáveis pela disseminação ambiental de oocistos que contaminam o homem e os animais de produção, cuja carne é fonte de contaminação. Este ciclo poderá ser interrompido se os gatos puderem ingerir a vacina efetiva por via oral em iscas ambientais, protegendo de qualquer infecção por presas contaminadas, interrompendo a rede causal da toxoplasmose, além de ser a via mais fácil de administração. No caso de animais carnívoros o uso de iscas como veículo para distribuição de imunógenos vem sendo utilizada com sucesso há alguns anos na vacinação contra a raiva (RABORAL VR-G[®]). Esta vacina produzida nos Estados Unidos, utilizando um vetor viral já é utilizada a mais de dez anos. Estas iscas são produzidas com carne de peixe e

distribuídas em grandes áreas para a imunização de cães, gatos, raposas entre outros animais com efetiva segurança e resultados eficazes, contribuindo com o controle da raiva em muitos países (MACKOWIAK *et al.*, 1999).

Para este fim é fundamental entendermos o papel da imunidade de mucosa na toxoplasmose e imunizações por via oral necessitam de estudos mais detalhados, pois mimetizam a rota natural de entrada de diversos parasitas no hospedeiro, principalmente *T. gondii* e o uso da radiação ionizante pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de uma vacina para uso comercial em animais, principalmente gatos, diminuindo assim a transmissão da toxoplasmose.

II OBJETIVOS

Geral

Estudar a imunidade sérica e intestinal contra o *T. gondii* em camundongos, induzida por taquízoitos irradiados com 255Gy, do ponto de vista celular e humoral.

Específicos

Avaliar a funcionalidade celular do parasita, após o trânsito estomacal, em camundongos imunizados por via oral.

Avaliar a produção de IgG, IgA e IgM sérica, em camundongos imunizados por via oral ou parenteral

Determinar as diferenças na produção de subclasses de IgG sérica em camundongos imunizados por via oral ou parenteral

Avaliar a maturação e diferenças da avidéz de IgG em camundongos imunizados por via oral ou parenteral.

Avaliar a excreção fecal de IgG, IgA e IgM em camundongos imunizados por via oral ou parenteral.

Determinar as diferenças de expressão das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos e células intestinais, de camundongos imunizados por via oral e parenteral.

Avaliar a diferença de proteção induzida em animais imunizados por via oral ou parenteral, com desafio com cepa cistogênica.

Avaliar o comportamento e sobrevivência, em animais deficientes de IFN- γ , quando imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*.

Determinar e quantificar a produção sérica das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, em animais IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados por via oral ou parenteral.

Avaliar e quantificar a excreção nas fezes das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, em animais IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados por via oral ou parenteral.

III MATERIAL E MÉTODOS

Todos os sais e demais reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise sendo a água deionizada purificada em sistema Milli-Q[®] (Millipore[®]), apresentando resistividade de 18,2 mega Ω . Reagentes específicos têm sua fonte citada ao longo do texto.

3.1 Parasitas.

Os parasitas utilizados nos ensaios são mantidos rotineiramente no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (USP - Universidade de São Paulo).

3.1.1 Cepa RH (*virulenta*).

Taquizoítos da cepa RH (ATCC nº 50174) são mantidos por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss ou C57Bl/6j. Os animais previamente infectados são sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ e o peritônio lavado com solução salina ou solução salina tamponada com fosfato – NaCl 0,15 M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS), contendo Penicilina Cristalina 2500 UI/mL e Estreptomicina 10 mg/mL.

Após quantificação em câmara de Neubauer, os taquizoítos são inoculados (i.p) em novos animais.

3.1.2 Cepa ME49 (cistogênica).

Cistos da cepa ME49 (ATCC nº 50611) utilizada no desafio dos animais imunizados foram gentilmente cedidos ao laboratório pelo Prof. Dr. Fausto Araújo, (UCLA - University of California, Los Angeles). Esta cepa é mantida através de sucessivas passagens, com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos Swiss ou C57Bl/6j. Cada animal foi inoculado por via oral (v.o), com uma suspensão de 10 cistos/animal, obtida após macerado de cérebro de camundongos previamente infectados, com 3,0 mL de PBS pH 7,2 estéril.

Para a quantificação dos cistos, 25 µL da suspensão cerebral foram colocados entre lâmina e lamínula e observados ao microscópio de luz, sob objetiva de 40X, com determinação do número de cistos por cérebro analisado.

3.2 Animais experimentais.

Para os experimentos de imunização e desafio utilizamos camundongos machos C57Bl/6j e BALB/c (isogênicos), todos com peso variando entre 20 e 22g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP. Foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada, recebendo ração comercial Nuvital® e água *ad libitum*.

Para alguns experimentos também utilizamos camundongos C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$, cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos (CEMIB/UNICAMP) ao biotério do IPEN.

Todos os animais utilizados foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a manipulação dos mesmos foi conduzida de acordo com as normas de cuidados de animais de laboratório (Clark, 1996) e com os “Princípios de ética em

experimentação animal” (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Nosso projeto também foi submetido e recebeu a aprovação pela Comissão de ética em pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3.3 Irradiação dos taquizoítos de *T. gondii*.

Para a obtenção das preparações vacinais, utilizamos taquizoítos previamente purificados de *T. gondii* da cepa RH. Esses parasitas foram retirados de animais previamente infectados, através da lavagem peritoneal com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma[®]) e mantidos em banho de gelo durante todo o processo.

Esses parasitas foram então quantificados e submetidos à irradiação, na dose de 255 Gy com blindagem de 90%, pela exposição a raios γ de uma fonte de ⁶⁰Co (GAMMACELL[®], Atomic Energy of Canada, Ltd.), de forma homogênea, com uma taxa de dose de 3,84 KGy/h, em temperatura ambiente e na presença de oxigênio (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

O grupo controle permaneceu na parte externa da fonte durante todo o tempo de irradiação, para avaliação das condições ambientais. Após a irradiação a viabilidade das amostras foi determinada utilizando o corante Azul de Tripiano, sendo utilizados apenas lotes com viabilidade maior de 95%.

Após a irradiação foi acrescentado, soro fetal bovino inativado (volume final 50%) e 5% DMSO volume final (Synth[®]), e em seguida aliquotados no volume de 1 mL (concentração final 1×10^8 taquizoítos/mL) em tubos plásticos de congelamento e mantidos à temperatura de -70 °C durante 24 horas e após transferidas para o nitrogênio líquido (-196 °C), onde permaneceram até o momento do uso. O mesmo

procedimento foi realizado com os parasitas não irradiados e utilizados como controle.

3.4 Imunização dos animais.

Camundongos C57Bl/6j, BALB/c e C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ foram divididos em grupos de 5 animais, imunizados com três doses de 1×10^7 parasitas/animal a cada 15 dias, com taquizoítos irradiados a 255 Gy, por via parenteral ou por via oral utilizando sonda gástrica e tendo como veículo hidróxido de alumínio (anti-ácido) (v/v). A adição de hidróxido de alumínio foi empregada para aumentar a viabilidade dos parasitas até a mucosa intestinal dos animais. Como grupos controle foram utilizados animais infectados com parasitas não irradiados, que receberam a mesma carga parasitária pelas mesmas vias de inóculos.

3.5 Obtenção do antígeno de *Toxoplasma gondii*.

Os parasitas obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente inoculados foram inicialmente filtrados em membrana de polycarbonato de 3.0 μm (ISOPORE™, Millipore®) para remoção de outros tipos celulares presentes após o lavado.

Os parasitas purificados foram submetidos à sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA), a 40 ciclos por 5-10 períodos de 30 segundos, em banho de gelo, até a lise completa dos agentes. Em seguida, acrescentou-se solução de NaCl 0,3 M para isotonzar a suspensão, e após, submetido a

centrifugação a 10000g por 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno (CAMARGO *et al.*, 1978).

A proteína total foi determinada utilizando o método de Bradford, tendo gama-globulina humana como padrão (BRADFORD, 1976). O antígeno foi alíquotado e mantido à -80 °C até o momento do uso nos ensaios.

3.6 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal.

Animais previamente imunizados por via oral com 10^7 parasitas com hidróxido de alumínio, foram sacrificados em diferentes tempos após inóculo. Segmentos iniciais do intestino delgado foram retirados e adicionados em 1,0 ml de aldeído glutárico a 1,5% com PBS e mantidas a 4 °C.

Em seguida as amostras foram misturadas a 20 µL de gelatina 2% diluída em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e gelificados. O material foi novamente tratado com aldeído glutárico 1,5% + paraformaldeído 1% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,08 M pH 7,4 + 2,5% de sacarose por 2 horas a 4 °C com agitação de 5 em 5 minutos. As amostras foram contrastadas em tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 2 horas e posteriormente lavadas em solução fisiológica e deixadas em acetado de uranila por 18 horas, sendo então desidratadas e incluídas em resina Araldite[®]. Cortes ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico ZEISS[®] EM-10-9 e micrografados (DUARTE *et al.*, 1992).

3.7 Obtenção das amostras de soro dos animais imunizados.

As amostras de sangue dos animais foram obtidas, semanalmente, por secção leve da extremidade da cauda e coletadas em papéis de filtro, com diâmetro de 5 mm (~5 µL) e estocadas secas a -20 °C. Antes do uso, o soro foi extraído com 100 µL de PBS sobre o papel por 18 horas a 4 °C, sendo o eluato do papel considerado numa diluição 1/100 do soro.

3.8 Detecção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro dos animais imunizados, por ELISA.

Placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL (10 µg/mL) de antígeno salino de *T. gondii*, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, por 20hs à 4 °C em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) por 5 minutos e bloqueadas com PBST + 3% leite desnatado (Molico®), durante 1 hora em estufa a 37 °C.

Após bloqueio, as amostras de soros (100 µL/poço), foram depositadas nas placas e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após quatro novas lavagens com PBST, foram aplicados 100 µL por poço de diluições de conjugado anti-IgG (1/20000), anti-IgA (1/10000) ou anti-IgM (1/5000) de camundongo, conjugado a peroxidase (Sigma®), com incubação por 1 hora a 37 °C. Após lavagens, a revelação da reação foi realizada pela adição de OPD (1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5,0) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCl 4 N.

As leituras das densidades ópticas (D.O.) foram realizadas em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS®) a 492 nm (VENKATESAN &

WALKELIN, 1993). Os resultados foram expressos arbitrariamente em índice de reatividade (IR) seguindo a fórmula:

$$\text{IR} = \frac{\text{D.O da amostra}}{\text{D.O. do animal negativo}}$$

3.9 Determinação das subclasses de IgG em camundongos C57Bl/6j e BALB/c.

A análise das subclasses nos soros dos animais imunizados foi realizada através de ELISA, como já descrito anteriormente. Para a determinação das subclasses foram utilizados 100 µL por poço de conjugado anti-IgG1, anti-IgG2a ou anti-IgG2b de camundongo, conjugado a peroxidase (Southern Biotechnology Associates[®]), diluído 1/2000 em PBS, e incubado por 1 hora a 37 °C. Após seis lavagens, a revelação da reação foi realizada pela adição de OPD (1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0) e interrompida após 30 minutos pela adição de ácido cítrico 0,2 M.

A leitura das densidades ópticas foi feita em leitor automático de microplacas a 450 nm (Dynatech MR4000[®]). Os resultados foram expressos arbitrariamente em índice de reatividade (IR), como já descrito anteriormente.

3.10 Obtenção da suspensão fecal dos animais imunizados.

Amostras de fezes dos camundongos, imunizados via oral e via intraperitoneal, foram coletadas três vezes por semana por todo o período da imunização, com determinação prévia do peso das amostras.

Os cíbalos dos animais foram macerados e homogeneizados em 5 mL de solução de PBS + PMSF (2 mM). Em seguida foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos para a separação da fase sólida. O sobrenadante foi então estocado e mantido a -80 °C (Li *et al.*, 2001).

Para concentração dos anticorpos o *pool* de extrato fecal, separado semanalmente, foi mantido em banho de gelo e adicionado o mesmo volume de tampão borato de sódio (0,1 M pH 7,4) em seguida foi lentamente acrescido sulfato de amônia saturado (v/v). O material foi em seguida centrifugado por 20 minutos a 4000 g a 4 °C. Após esse processo o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em PBS + PMSF (2 mM). As amostras permaneceram estocadas à -80 °C até o momento do ensaio (HUDSON & HAY, 1989).

3.11 Detecção de anticorpos IgG, IgA e IgM, nas suspensões fecais, por ELISA.

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL (10 µg/mL) de antígeno salino de *T. gondii*, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, por 20hs à 4 °C em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) por 5 minutos e bloqueadas com PBST + 3% de leite desnatado (Molico[®]), durante 1 hora em estufa a 37 °C. Após bloqueio, as amostras de extratos fecais (100 µL/poço), foram depositadas nas placas e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após quatro novas lavagens com PBST, foram aplicados 100 µL por poço de diluições de conjugado anti-IgG (1/20000), anti-IgA (1/10000) ou anti-IgM (1/5000) de camundongo, conjugado a peroxidase (Sigma[®]), com incubação por 1 hora a 37 °C. Após lavagens, a revelação da reação foi

realizada pela adição de OPD (1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5,0) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCl 4 N.

As leituras das densidades ópticas (D.O.) foram realizadas em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS[®]) a 492 nm (VENKATESAN & WALKELIN, 1993). Os resultados foram expressos arbitrariamente em índice de reatividade.

3.12 Avaliação da expressão relativa de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos e células intestinais de animais imunizados, por *Real-Time* PCR.

3.12.1 Obtenção dos esplenócitos e células intestinais.

As células esplênicas e intestinais foram obtidas de camundongos imunizados e não imunizados. As células foram retiradas de maneira estéril em fluxo laminar, sendo as células esplênicas e intestinais (placas de Peyer) dissociadas em peneira de aço inoxidável (mesh 50) (Sigma[®]) na presença de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 100 U/mL Penicilina, 100 μ g/mL Estreptomicina e 0,25 μ g/mL Anfotericina B. No caso das células esplênicas, para remoção das hemácias foi utilizada uma solução de cloreto de amônio adicionado em igual volume, e então centrifugados a 1500 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

As células intestinais e os esplenócitos foram contados em câmara de Neubauer e ajustadas para concentração 2×10^7 células/mL, em RPMI 1640 com 10% de SFB e antibióticos. As células foram então distribuídas em placas de cultura sensibilizadas numa concentração de 2×10^6 células/poço e foram mantidas em

estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 48 horas, na presença de antígeno de *T. gondii* (10 µg/mL).

3.12.2 Extração e quantificação de RNA.

Após esse período as células foram homogeneizadas no reagente Trizol[®] (Invitrogen[®]) e mantidas até o momento da extração a -80 °C. O RNA foi extraído seguindo as especificações do fabricante sendo suas concentrações determinadas por leitura da absorbância a 260, 280 e 320 nm em espectrofotômetro Ultrospec300[®] (Pharmacia Biotech[®]).

3.12.3 Síntese de cDNA.

As bibliotecas de cDNA foram sintetizadas por transcrição reversa a partir de 5 µg de RNA total utilizando M-MLV RT e Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen[®]). As amostras de cDNA foram mantidas em freezer -20 °C até a realização dos ensaios de *real-time* PCR.

3.12.4 Confeção dos primers e eficiência de detecção.

Todos os primers utilizados foram desenhados utilizando o software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e as seqüências obtidas no banco de dados NCBI Nucleotide Databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para utilização no ensaio de *real-time* PCR, todos os *primers* foram testados e as reações padronizadas, sendo a eficiência da reação determinada pela fórmula:

$$E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

Todos os primers utilizados apresentaram eficiência igual ou superior a 90%, como pode ser observado na tabela abaixo:

Tabela 1: Seqüência dos *primers* para IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e β -actina e respectiva eficiência da reação obtida na padronização do *real-time* PCR.

Primers		Seqüências	Produto (bp)	Eficiência
IFN- γ	Sense	5'-GTCCAGCGCCAAGCATTCAA-3'	391	90%
	Antisense	5'-GTCCCCCACCCCAGATACA-3'		
IL-2	Sense	5'-TGGAGCAGCTGTTGATGGAC-3'	363	93%
	Antisense	5'-GAGGGCTTGTTGAGATGATGCT-3'		
IL-4	Sense	5'-ACCCCCAGCTAGTTGTCATC-3'	307	94%
	Antisense	5'-CGAAAAGCCCGAAAGAGTC-3'		
IL-10	Sense	5'-CTCAGTTCCCATTCTATTTATTCAC-3'	336	92%
	Antisense	5'-GGATCTCCCTGGTTTCTCTTC-3'		
β -actina	Sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	349	91%
	Antisense	5'-TAAACGCAGCACAGTAACAGTCCG-3'		

3.12.5 Condições da reação e análise dos resultados.

Os ensaios de *real-time* PCR foram realizados no ABI Prism 7300 Sequence Detection System[®] (Applied Biosystems[®]), utilizando Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) seguindo protocolo do fabricante. O termociclador foi programado para realizar 95 °C por 10 minutos, 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto e seguido de um passo de denaturação. Os resultados foram expressos em valores de Ct (*cycle threshold* – número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção). Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Para a análise quantitativa foi adotada a mesma quantidade de cDNA em

todas as reações e utilizou-se a média dos valores de Ct obtidos das duplicatas. Para o cálculo da expressão gênica relativa foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o valor do $\Delta\Delta Ct$ foi obtido pela diferença entre o ΔCt dos animais imunizados e o ΔCt dos animais do grupo controle, como descrito por LIVAK *et al.*, 2001.

3.13 Desafio dos animais imunizados e quantificação do número de cistos.

Para a obtenção dos cistos de *T. gondii*, foram utilizados camundongos C57Bl/6j cronicamente infectados com cepa ME49. Os cérebros dos animais foram retirados e homogeneizados em Hank's (HBSS) com 30% de dextran, centrifugados a 3000 g a 4 °C por 10 minutos e o *pellet* re-suspendido em HBSS, a quantidade de cistos foi verificada por microscopia óptica convencional (BOOTH *et al.*, 1996).

Os camundongos imunizados foram desafiados após 15 dias da última dose com 10 cistos (v.o). Grupos controles, com camundongos não imunizados, foram inoculados com as mesmas quantidades de cistos. A mortalidade dos animais foi acompanhada diariamente e após um período de 30 dias, os camundongos foram sacrificados, por narcose com CO₂, e os cérebros homogeneizados em solução fisiológica (3mL), sendo uma alíquota (25µL) colocada entre lâmina e lamínula. O número de cistos foi determinado por microscopia óptica convencional e o resultado expresso em cistos/cérebro.

3.14 Análise estatística.

Todas as análises estatísticas foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 3.0.

A análise de sobrevivência dos animais foi feita utilizando a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, com comparações duas a duas.

A comparação do número de cistos cerebrais entre os grupos de animais imunizados foi feita utilizando o teste ANOVA (Análise de variância), com comparação por Bonferroni, para identificação da diferença entre os grupos.

IV RESULTADOS

4.1 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*.

Para o estudo da integridade do preparado vacinal, através do trato digestivo, realizamos a avaliação por microscopia eletrônica, como descrita em métodos.

Podemos notar que após a administração por via oral dos parasitas irradiados, não foi observado comprometimento da integridade da mucosa intestinal com total ausência de focos de inflamação ou necrose. A integridade das microvilosidades e dos enterócitos foi observada em todas as amostras, durante todo período avaliado. Todos os parasitas observados no interior da mucosa apresentaram estruturas preservadas como núcleo e principalmente a região do complexo apical, com suas estruturas características. Podemos observar na Figura 3, que após 30 minutos do inóculo dos taquizoítos irradiados, estes já se apresentavam no interior do epitélio intestinal.

No período de 4 horas e 30 minutos, notamos também o parasita muito bem conservado no interior da mucosa intestinal e a formação de uma estrutura característica ao redor do parasita, o vacúolo parasitóforo, como pode ser observado na Figura 4.

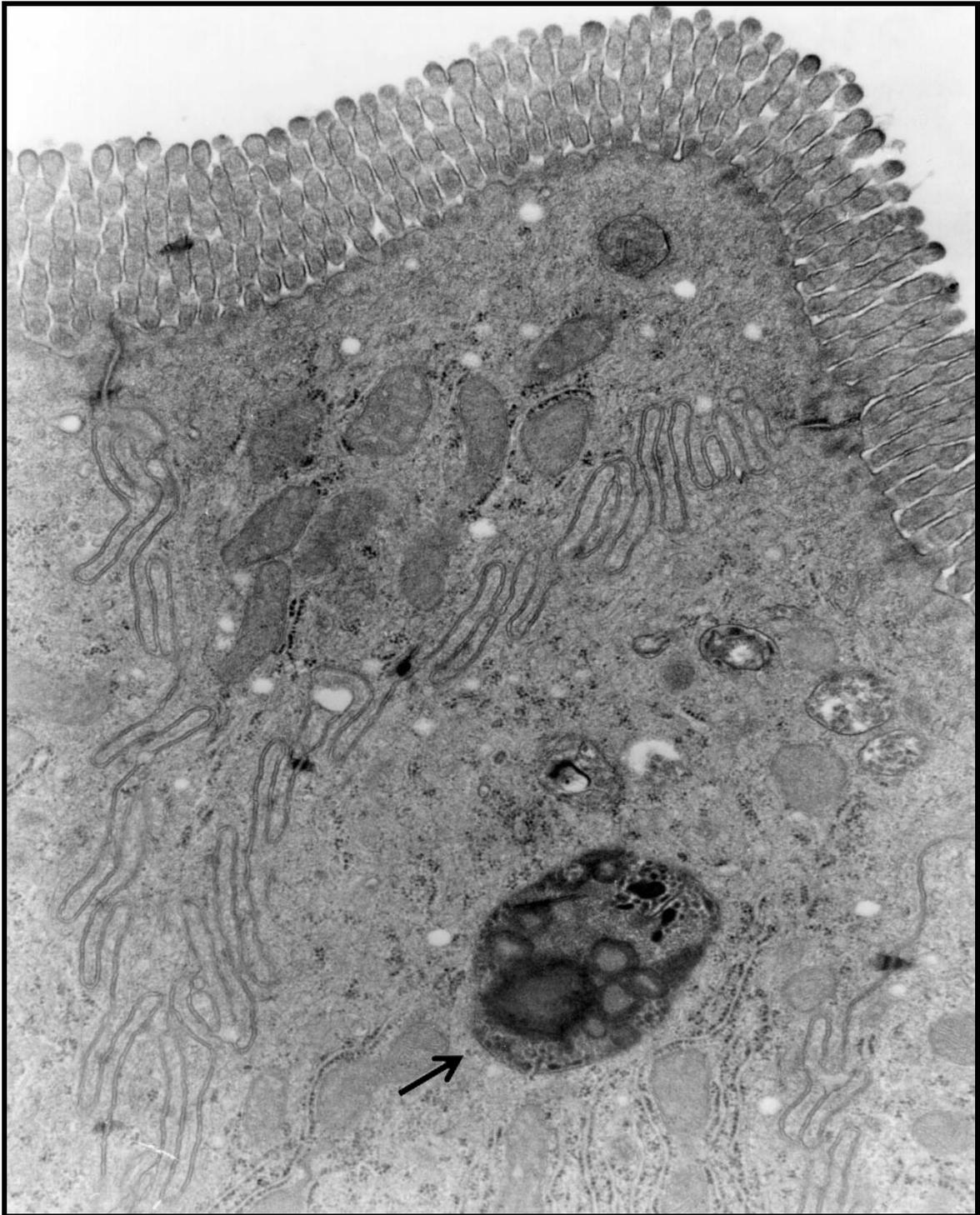


Figura 3 – Micrografia eletrônica da porção inicial do intestino delgado de camundongo C57BL/6j. A seta mostra um taquizoíta de *T. gondii*, no interior da mucosa intestinal, após 30 minutos do inóculo oral de parasitas irradiados a 255 Gy com hidróxido de alumínio. (30000X).

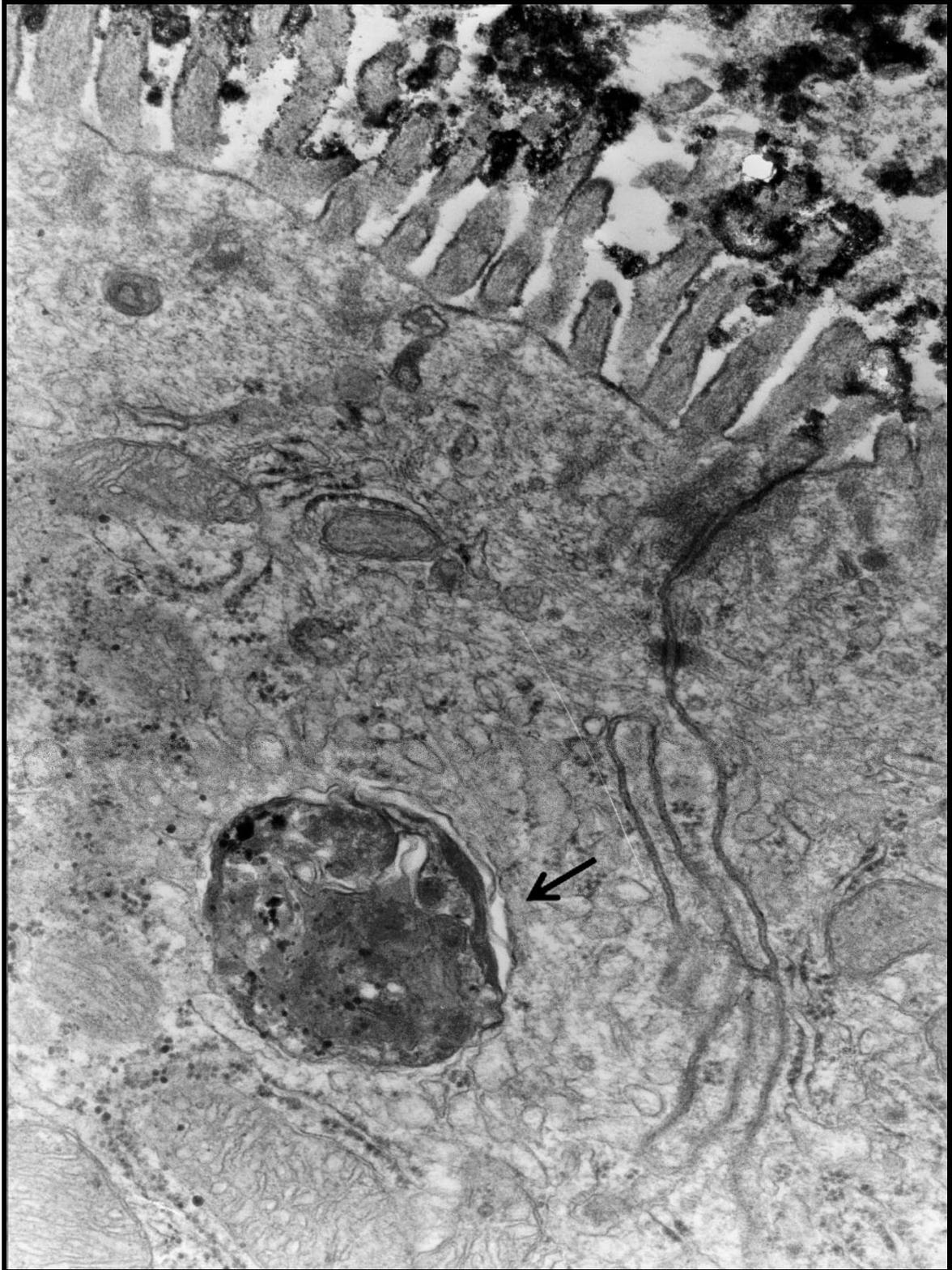


Figura 4 – Micrografia eletrônica da porção inicial do intestino delgado de camundongo C57BL/6j. A seta mostra um taquizoíto de *T. gondii*, no interior da mucosa intestinal, após 4 horas e 30 minutos do inóculo oral de parasitas irradiados a 255 Gy com hidróxido de alumínio. (50000X).

4.2 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy

Grupos de 5 animais (C57Bl/6j e BALB/c), foram imunizados com 10^7 taquizoítos irradiados por via i.p (sem veículo) e v.o (com hidróxido de alumínio), em intervalos quinzenais. O sangue caudal foi utilizado para a determinação das classes de anticorpos IgG, IgA e IgM por ELISA.

O ELISA para os camundongos C57Bl/6j, mostrou que a produção de IgG sérico foi maior nos animais imunizados por via parenteral. Quando avaliamos a resposta de IgA sérica no mesmo grupo, notamos que apesar de menos intensa em relação a resposta de IgG, o perfil de resposta foi semelhante em ambas as vias de imunização. Após as três doses, o grupo imunizado por via parenteral também apresentou a maior produção da resposta para IgM, sendo insignificante a produção dessa imunoglobulina nos animais imunizados por via oral (Figura 5).

Nos camundongos BALB/c, inoculados via oral e via parenteral, podemos notar que, quando avaliamos a resposta IgG no soro desses animais, observamos que novamente o grupo imunizado i.p apresentou os maiores níveis em relação aos animais imunizados por via oral. Na avaliação da produção de IgA foi possível notar que o grupo imunizado por via oral apresentou níveis bem mais intensos em relação a imunização parenteral. Na produção de IgM, houve uma resposta mais evidenciada nos animais que receberam o inóculo parenteral, apesar dos animais que receberam o inóculo por via oral apresentarem um pequeno aumento na produção dessa imunoglobulina (Figura 5). Toda a evolução da produção dessas imunoglobulinas pode ser observada no Anexo 1.

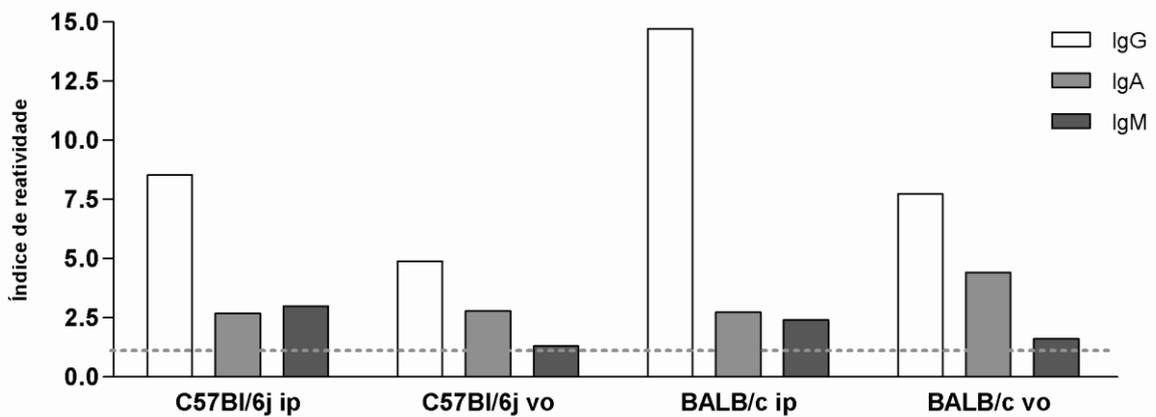


Figura 5 – Comparação da produção de anticorpos, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.3 Determinação das subclasses de imunoglobulina G

Através do ELISA específico de subclasses, foi possível determinar a proporção das diferentes subclasses de IgG produzida nos soros dos camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com taquizoítos irradiados, por via oral ou parenteral.

Nos grupos dos animais C57Bl/6j, foi possível notar a maior produção dos níveis da subclasse IgG2b, porém o grupo imunizado via oral apresentou níveis menores quando comparados com o grupo intraperitoneal. Nos grupos dos camundongos BALB/c, observamos um aumento na produção das subclasses IgG1 e IgG2b em ambas as vias de inoculação, mas também com diferença entre os grupos que receberam inóculo oral e intraperitoneal (Figura 6).

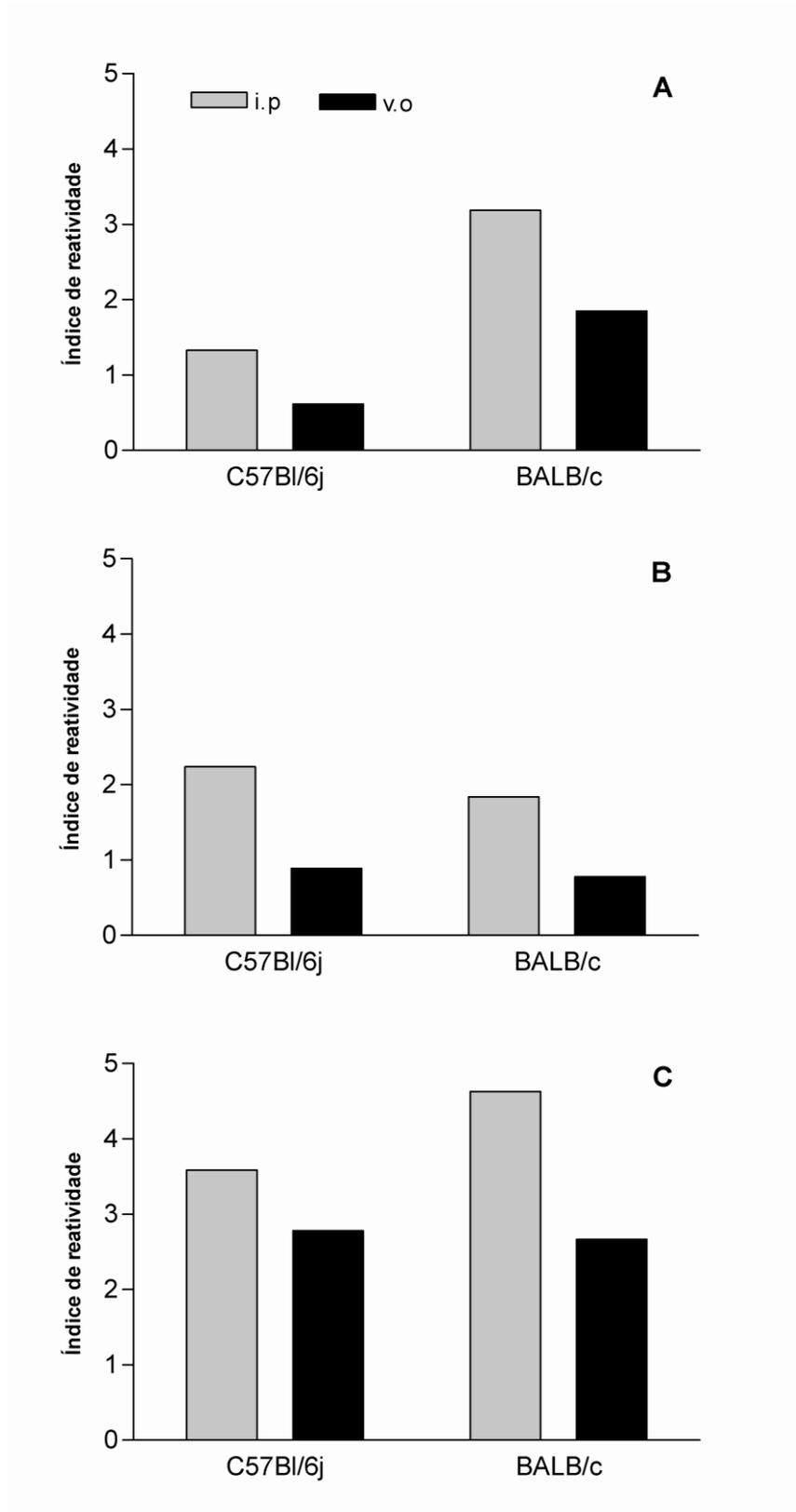


Figura 6 – Determinação das subclasses de IgG, IgG1(A), IgG2a(B) e IgG2b(C), produzidas no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com parasitas irradiados *T. gondii* (3 doses), por diferentes vias.

4.4 Avidéz no soro após imunização

Os resultados do ELISA para determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soro dos animais imunizados com parasitas irradiados, por via oral ou parenteral, estão demonstrados na Figura 7. Podemos notar que todos os grupos imunizados apresentaram níveis de avidéz semelhantes ou superiores aos animais infectados agudamente com cistos de ME49. Os grupos imunizados por via parenteral apresentaram maiores índices de avidéz quando comparados com o grupo que recebeu o inóculo por via oral, porém vale ressaltar que os animais C57Bl/6j apresentaram uma maturação da resposta mais rápida em relação aos grupos de animais BALB/c.

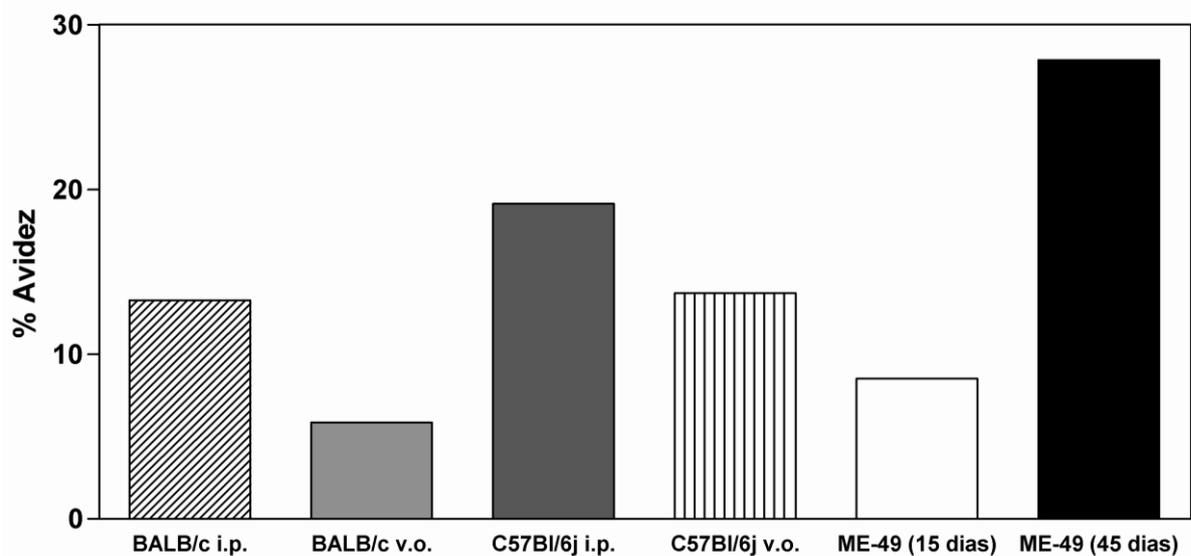


Figura 7 – Avidéz sérica dos camundongos C57Bl/6j e BALB/c, após imunização por via oral ou via intraperitoneal, com parasitas irradiados de *T. gondii*.

4.5 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com parasitas irradiados a 255 Gy

Para o estudo da produção de anticorpos pela mucosa intestinal dos animais imunizados (C57Bl/6j e BALB/c), foi realizado ELISA das fezes dos camundongos imunizados com 10^7 parasitas por via oral ou parenteral. Como podemos notar os animais C57Bl/6j, imunizados por via parenteral, não apresentaram excreção significativa de IgG e S-IgA, sendo detectado apenas um pequeno aumento de S-IgM. Nos animais C57Bl/6j, imunizados por via oral, notamos uma excreção mais intensa com relação à imunização parenteral, com uma excreção mais intensa de IgG e S-IgA (Figura 8).

Quando avaliamos a produção dessas imunoglobulinas em animais BALB/c, podemos notar que em ambas as vias de inoculação, ocorreu um aumento na excreção de todas as imunoglobulinas estudadas e superiores nos animais imunizados pela via parenteral. No entanto, os animais BALB/c imunizados por via oral apresentaram os maiores níveis de excreção de IgG e S-IgA. A evolução da excreção fecal dessas imunoglobulinas, nos modelos estudados, pode ser observada no Anexo 2.

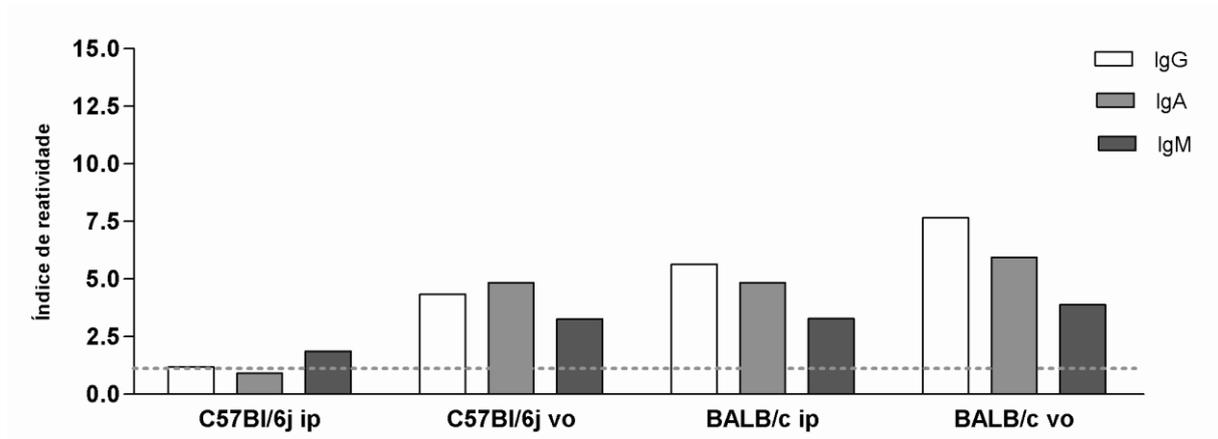


Figura 8 – Comparação da excreção de anticorpos, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.6 Quantificações relativas por *real-time* PCR, das citocinas (INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10), em esplenócitos e células intestinais, de camundongos imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados

Para a detecção da expressão de citocinas nas células esplênicas e intestinais dos camundongos imunizados, foi realizado o *real-time* PCR para a detecção das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10. Todos os valores foram obtidos em curvas de determinação da qualidade de cópias (Ct) e em seguida foi calculada a variação da expressão gênica através da comparação com a expressão de β -actina.

Como podemos observar, todos os grupos imunizados apresentaram expressão muito significativa de IFN- γ , por estímulo do antígeno de *T. gondii* por células esplênicas, expressão esta menos intensa apenas no grupo C57Bl/6j imunizado por via oral. Nos grupos imunizados por via intraperitoneal, observamos

um aumento da expressão de IL-4 e IL-10, sendo mais evidenciada no grupo BALB/c, via oral, a produção de IL-4 em relação aos demais grupos. Os grupos imunizados por via oral apresentaram níveis de expressão de IL-4 e IL-10, inferiores ao encontrado no grupo controle infectado com ME49 (Figura 9).

Quando avaliamos a expressão dessas citocinas pelas células intestinais (placas de Peyer), podemos notar que a maior produção de IFN- γ e IL-2 por estímulo do antígeno foi encontrada nos grupos imunizados por via oral (Figuras 10B e 10D), apesar do grupo C57Bl/6j apresentar também um pequeno aumento na expressão de IL-4 em relação ao grupo BALB/c. Neste mesmo material, mas em grupos imunizados por via parenteral, os camundongos C57Bl/6j apresentaram um maior aumento na expressão de IL-4 em relação as outras citocinas (Figura 10A), já no grupo BALB/c a maior expressão foi de IL-10, com uma acentuada diminuição de IFN- γ (Figura 10B). O grupo infectado cronicamente com ME49 apresentou baixa produção em todas as citocinas estudadas, sendo um pouco mais significativa a expressão de IFN- γ (Figura 10E), menos que nos animais imunizados.

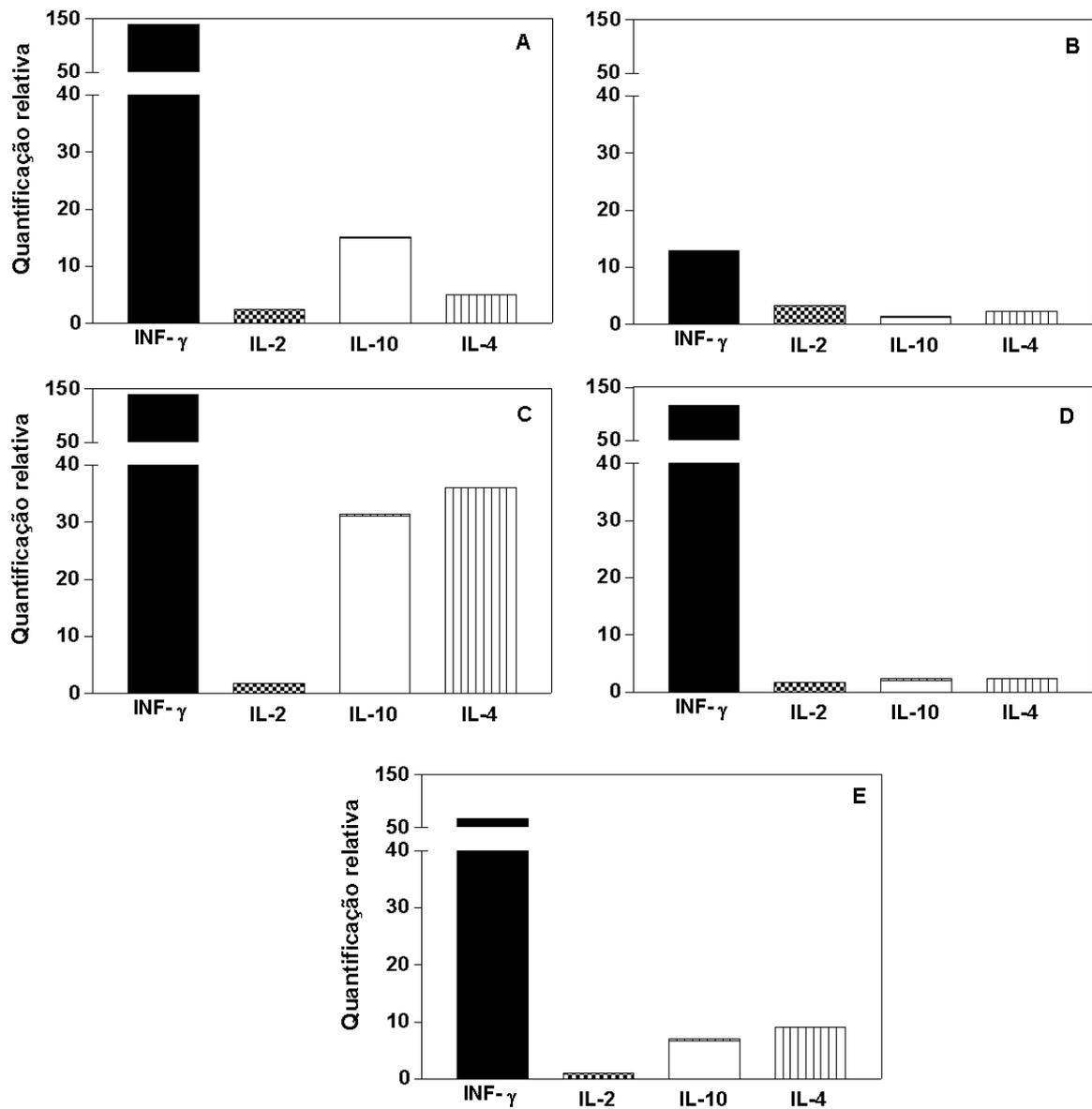


Figura 9 – Quantificação relativa da expressão de citocinas por esplenócitos de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*, após 48 horas de estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii*. (A) C57Bl/6j i.p., (B) C57Bl/6j v.o., (C) BALB/c i.p., (D) BALB/c v.o. e (E) camundongo cronicamente infectado com ME49.

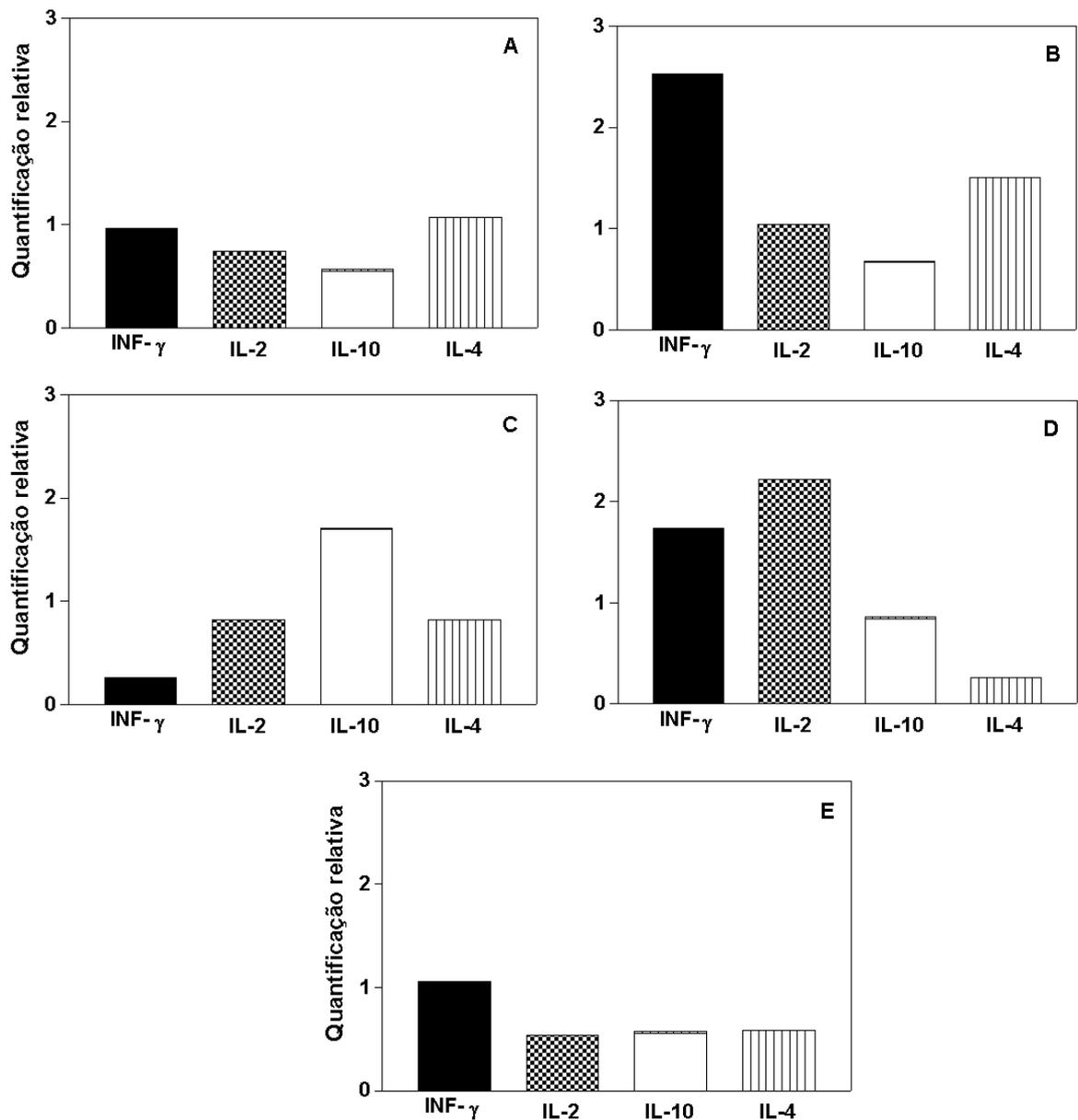


Figura 10 – Quantificação relativa da expressão de citocinas em células intestinais (placas de Peyer) de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*, após 48 horas de estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii*. (A) C57Bl/6j i.p, (B) C57Bl/6j v.o, (C) BALB/c i.p, (D) BALB/c v.o e (E) camundongo cronicamente infectado com ME49.

4.7 Desafio com cistos da cepa ME49 nos animais imunizados com taquizoítos irradiados

Os diferentes níveis de proteção entre as diferentes linhagens de camundongos, imunizados com taquizoítos irradiados a 255 Gy e inoculados por via oral e por via parenteral foram determinados pela contagem de cistos cerebrais em animais sobreviventes.

Nos grupos controles após 15 dias do último inóculo, os animais (n=10) receberam cistos de ME49, por via oral. Não foi observada nenhuma morte em nenhum grupo imunizado, apenas 2 mortes no grupo C57BL/6j (não imunizado) na primeira semana do desafio, porém todos os demais animais apresentavam sinais clínicos de infecção com maior atividade no micro-isolador e eriçamento de pêlos.

Em ambos os grupos imunizados, foi possível notar eficientes níveis de proteção quando comparados com o grupo controle ($P < 0.05$), além de níveis semelhantes de proteção entre eles, como pode ser observado na Figura 16. Os camundongos BALB/c apresentaram os maiores níveis de proteção. Apesar do grupo BALB/c controle apresentar uma quantidade de cistos menor quando comparado com o grupo controle dos camundongos C57Bl/6j, o nível de proteção chegou a mais de 90%, sendo observados raros cistos em alguns animais de cada grupo imunizado, como mostra a Figura 11.

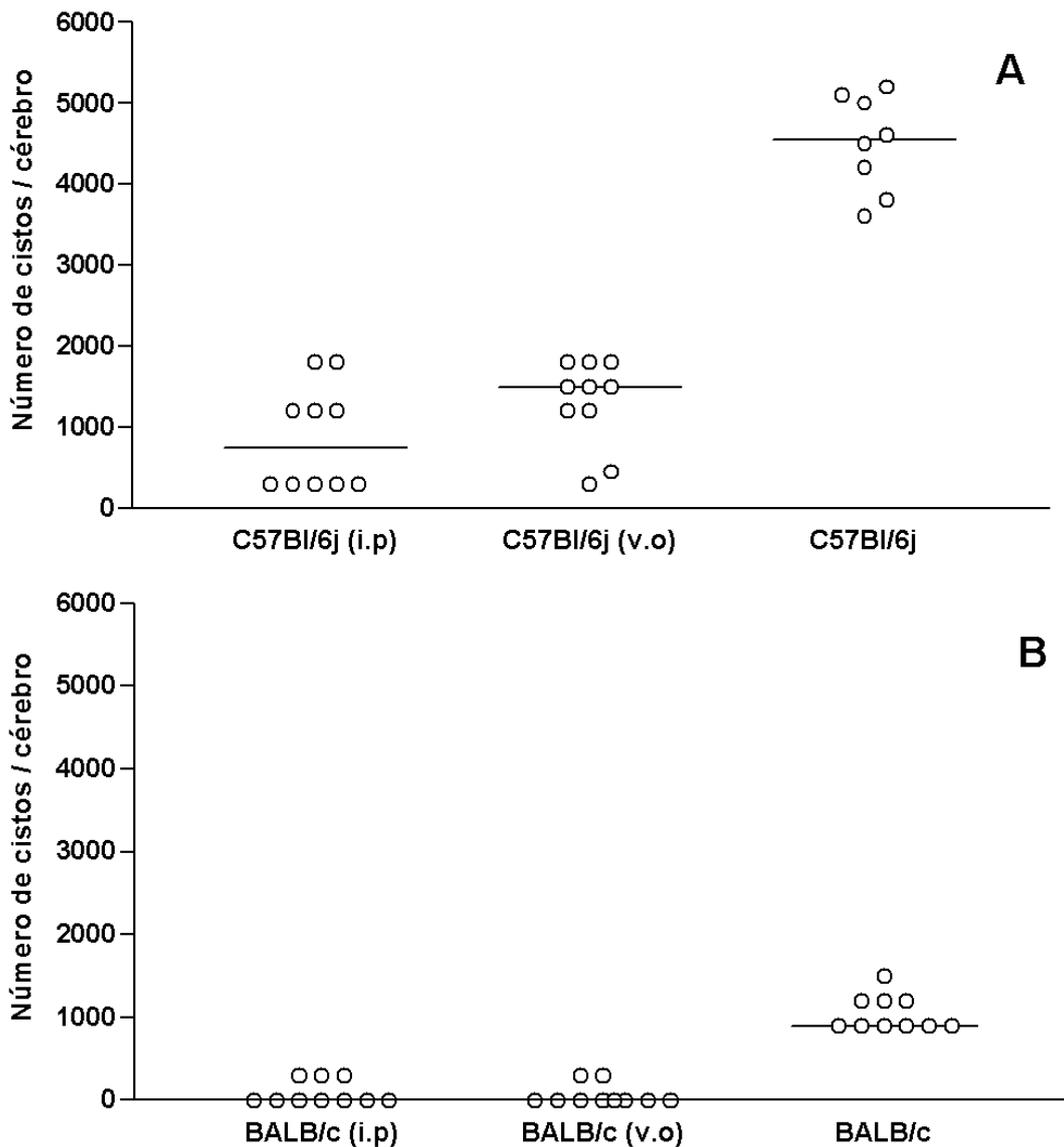


Figura 11 – Número de cistos cerebrais, identificados por microscopia de contraste de fase, após 30 dias do desafio oral com 10 cistos de ME49, em camundongos (A) C57Bl/6j e (B) BALB/c, imunizados via oral e via intraperitoneal, com parasitas irradiados de *T. gondii*.

4.8 Imunização e desafio dos animais geneticamente deficientes de IFN- γ

Como forma de avaliarmos o processo de imunização e a segurança das preparações vacinais, realizamos a imunização por via oral e intraperitoneal em camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ (n=10), com parasitas irradiados de *T. gondii*. Não foi

observada nenhuma morte durante os 45 dias de imunização dos animais, bem como, nenhuma outra alteração comportamental em nenhum dos grupos, independentemente das vias empregadas.

Após o período de imunização dos animais, todos os grupos receberam 10 cistos de ME49 (via oral). Notamos que entre o período do 10^o ao 12^o dia ocorreu a morte de todos os animais IFN- γ ^{-/-} do grupo controle. Os demais grupos imunizados também apresentaram algumas mortes entre o período do 10^o ao 15^o dia, mas em ambos os grupos 20% dos animais sobreviveram até o final do experimento (30 dias), como podemos observar na Figura 12. Todos os grupos, imunizados e posteriormente desafiados, apresentaram significância ($P < 0.05$) em relação aos grupos controles.

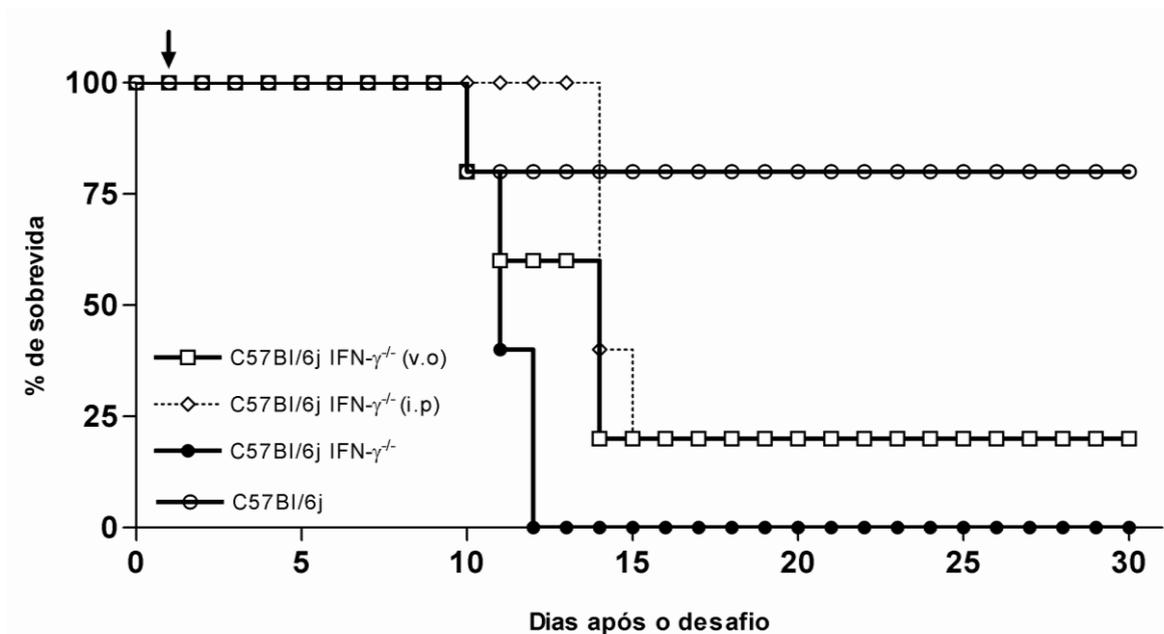


Figura 12 – Sobrevivência dos camundongos C57Bl/6j IFN- γ ^{-/-}, imunizados por via oral ou intraperitoneal, com parasitas irradiados de *T. gondii* (3 doses) e desafiados com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME49.

4.9 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados com parasitas irradiados a 255 Gy.

Grupos de 10 animais (C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$) foram imunizados com 10^7 taquizoítos irradiados por via parenteral (sem veículo) e por via oral (com hidróxido de alumínio), em intervalos quinzenais. O sangue caudal foi utilizado para a determinação dos níveis de IgG, IgA e IgM por ELISA.

Como podemos notar na Figura 13, os animais C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados por via parenteral, apresentaram maiores níveis de IgG em comparação com os animais imunizados por via oral. Esses níveis foram semelhantes ao grupo de animais não deficientes e imunizados pela mesma via e foram superiores aos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados por via oral. Quando avaliamos a produção de IgA no soros dos animais, observamos uma produção significativa em todos os grupos analisados, com uma menor produção pelos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados por via oral. Na avaliação da produção de IgM nos soro dos grupos imunizados, notamos uma produção significativa apenas nos animais imunizados por via parenteral, com uma produção mais acentuada nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ (Figura 13). Toda a evolução da produção dessas imunoglobulinas pode ser observada no Anexo 3.

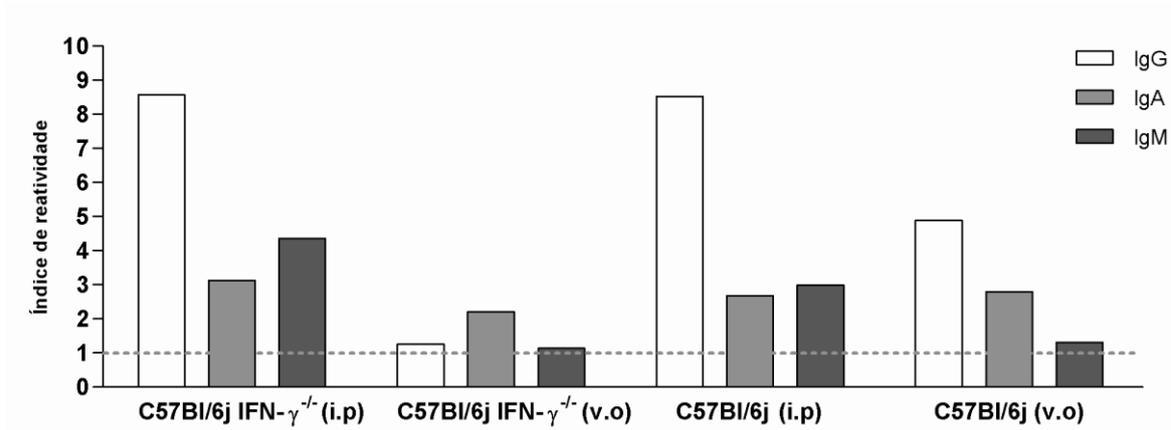


Figura 13 – Comparação da produção de anticorpos, no soro de camundongos C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ e C57Bl/6j, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.10 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados com parasitas irradiados a 255 Gy

Para avaliarmos a produção de imunoglobulinas excretadas nas fezes dos animais C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*, realizamos ELISA nas amostras de suspensões fecais dos grupos.

Na avaliação da excreção de IgG nas fezes, notamos que todos os grupos apresentaram excreção dessa imunoglobulina, sendo menos evidenciada no grupo C57BL/6j imunizado por via parenteral e mais evidenciada no mesmo grupo imunizado por via oral. A produção de S-IgA e S-IgM apresentaram um aumento substancial de excreção nos animais deficientes de IFN- γ , após as imunizações (Figura 14). Toda a evolução, por todo o período da imunização, da excreção dessas imunoglobulinas pode ser observada no Anexo 4.

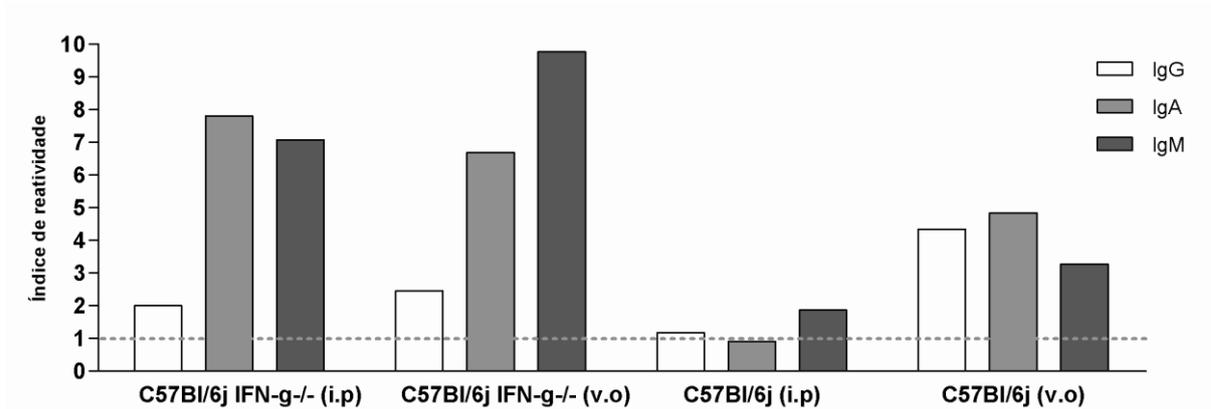


Figura 14 – Comparação da excreção de anticorpos, nas fezes de camundongos C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ e C57Bl/6j, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.11 Desafio com cistos da cepa ME49 dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados com taquizoítos irradiados

Após o período de imunização, os animais foram submetidos ao desafio oral com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME49. Podemos observar que em ambos os grupos houve um aumento na sobrevivência dos animais, sendo levemente maior nos animais imunizados pela via parenteral. Após o 15º dia do desafio, 20% dos animais não apresentavam nenhum sinal da doença e permaneceram vivos até o 30º dia após o desafio, onde foram sacrificados e o número de cistos em seus cérebros determinados.

O grupo C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ que recebeu a imunização por via parenteral foi o grupo com a menor quantificação de cistos no cérebro, após o desafio ($P < 0.05$). Os animais que receberam o inóculo por via oral apresentaram uma quantidade maior de cistos cerebrais, semelhantes aos animais não imunizados e sem deficiência de IFN- γ , como podemos observar na Figura 15.

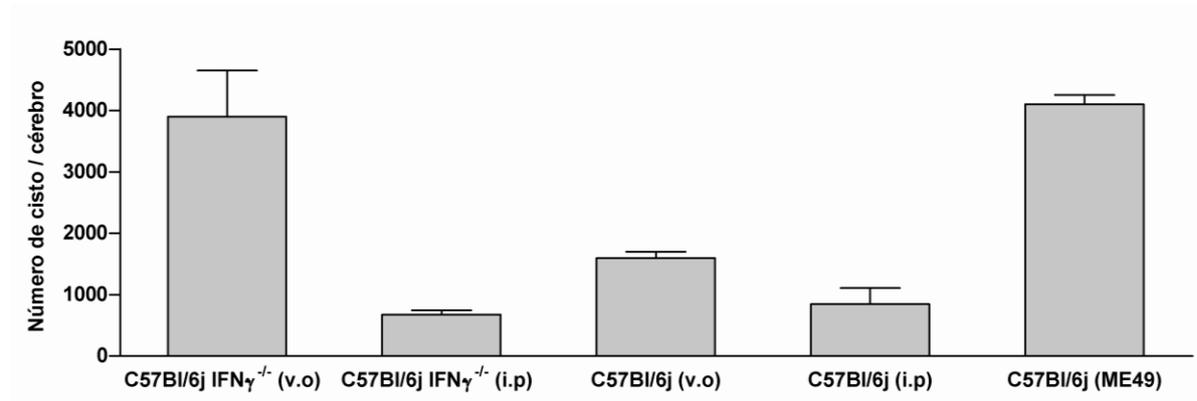


Figura 15 – Determinação, por microscopia de contraste de fase, da quantidade de cistos cerebrais em camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados e sobreviventes, após 30 dias do desafio com 10 cistos da cepa ME49.

V DISCUSSÃO

Como já havia sido comprovado anteriormente pelo nosso grupo, não houve alteração das características de biologia celular do *T. gondii*, após o processo de radiação ionizante a 255 Gy, bem como houve preservação de sua capacidade de invasão “*in vivo*” das células intestinais. Esses achados confirmam os encontrados por HIRAMOTO e col. (2002), onde os parasitas apresentavam suas características de invasão “*in vitro*” preservadas, mesmo após irradiação a 255 Gy, em células LLC-MK2 e fibroblasto humano. Nossos dados são importantes porque ainda não havia sido confirmada a manutenção dessas características, durante o processo natural de invasão “*in vivo*”.

Há poucos estudos de imunidade utilizando parasitas de *T. gondii* por via oral, porém algumas tentativas utilizando oocistos irradiados, na dose igual ou superior a 0,25 Kgy, quando inoculados por via oral, apresentavam proteção contra a formação de cistos nos cérebros de camundongos desafiados com oocistos viáveis (DUBEY *et al.*, 1996b). Tentativas de imunizações orais, utilizando antígenos isolados de *T. gondii*, já foram realizadas no passado por nosso grupo, porém não foi possível obter uma produção de anticorpos satisfatória, ou proteção contra a formação de cistos (dados não mostrados). Contudo, outros grupos utilizando imunizações com antígenos de *T. gondii* em associação com toxina colérica, induziram uma melhor qualidade da resposta imune sistêmica e de mucosa, mas sem proteção quando foram desafiados com cistos da cepa 76K, apresentando baixos níveis de proteção (BOURGUIN *et al.*, 1993).

Em estudos anteriores, realizados por nós, com taquizoítos irradiados e administrados por via oral, foi possível observar uma intensa resposta sérica e

intestinal contra o *T. gondii*, com proteção parcial da formação de cistos em camundongos C57Bl/6j (GALISTEO Jr *et al.*, 2005), no entanto, essa resposta poderia ser desencadeada por restos imunogênicos dos taquizoítos digeridos pelo estômago dos camundongos.

Pela observação por microscopia eletrônica, podemos notar a qualidade da proteção dos parasitas pelo hidróxido de alumínio, demonstrando que o uso desse veículo não interfere na penetração das células pelos parasitas e ainda mantém todas as condições para que os taquizoítos ultrapassem as barreiras do trato digestivo, da forma mais íntegra possível. Essa abordagem é muito importante, porque para o sucesso da imunização oral, é necessária uma efetiva apresentação dos antígenos nos sítios de indução imune na mucosa intestinal, como nas placas de Peyer e epitélio intestinal (CRIPPS *et al.*, 2001). A integridade do parasita e sua capacidade de penetração em células intestinais são essenciais para a produção de uma resposta imune protetora adequada, sendo esta abordagem, a mais próxima do que ocorre na natureza (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

Todas as linhagens de camundongos imunizados apresentaram níveis detectáveis e um aumento progressivo na produção de IgG sérica. Os níveis de IgG detectados nos soros das diferentes linhagens de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados a 255 Gy, foram menores nos animais imunizados via oral. Esses resultados foram observados anteriormente em camundongos C57Bl/6j, quando imunizados com taquizoítos irradiados e utilizada como via a inoculação oral (GALISTEO Jr *et al.*, 2005). Vale notar que a exposição dos antígenos no trato gastrointestinal é capaz de induzir uma resposta humoral sistêmica, porém com menor intensidade do que quando a exposição é feita por via parenteral (OGRA & METECKY, 1994). Este fato foi muito bem observado quando analisamos os níveis

de IgG produzidos em nossos modelos. Perfil semelhante de resposta foi observado em outros modelos utilizando partículas de lipossomos contendo antígenos de *Escherichia coli*, e quando administrado por via oral, apresentou níveis de IgG elevados no soro, e conseqüente diminuição da infecção por *E. coli* (Tana *et al.*, 2003).

O mesmo padrão de resposta foi observado quando avaliamos a produção de IgA no soro das linhagens estudadas. Apenas nos animais da linhagem BALB/c, imunizados por via oral, foram observados os maiores níveis, desde o primeiro inóculo. Sabe-se que a IgA sérica tem um importante papel em bacteremias, evitando a septicemia e a doença (VAN EGMOND *et al.*, 2001), é a segunda mais abundante imunoglobulina produzida no soro, com cerca de 20% do total e apresenta atividade pró-inflamatória (VAN EGMOND, *et al.*, 2001). Atualmente a vacina comercial para *Giardia* (GiardiaVax[®], Fort Dodge Animal Health), desenvolvida com antígenos de trofozoítos, demonstrou uma alta imunidade protetora em cães. Esse fato está relacionado principalmente pelos altos níveis de IgG e IgA presentes no soro e na mucosa dos animais vacinados, demonstrando mais uma vez a importância dessa imunoglobulina na proteção sistêmica contra parasitas (OLSON *et al.*, 1997; OLSON *et al.*, 1996). Estudos recentes de imunização com proteína recombinante rCWP2 de *Giardia duodenalis*, mostraram que altos níveis de IgA sérica, também foram muito importantes na inibição da liberação de cistos, diminuindo assim a transmissão da doença (LAROCQUE *et al.*, 2003). Esses e nossos dados sugerem que a IgA sérica tem uma importante função como uma das linhas de defesa sistêmicas do organismo contra o *T. gondii*, como já descrito pela inibição na invasão de enterócitos, pela S-IgA (MACK & McLEOD, 1992).

Quando avaliamos a produção de IgM sérico nessas amostras, notamos que apenas houve uma produção mais significativa nos animais imunizados por via intraperitoneal, demonstrando mais uma vez a diferença de resposta quando utilizamos vias de imunizações diferentes. Dados já comprovaram que altos níveis de IgA e IgM no soro de ratos, auxiliam na resistência a infecções por *T. gondii*, demonstrando dessa forma a importância dessas imunoglobulinas no combate a infecção (GODARD *et al.*, 1990). Outros autores demonstraram que bons níveis de IgM tem um importante papel no controle da disseminação sistêmica de taquizoítos, durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* (COUPER *et al.*, 2005). Em nossos ensaios houve uma queda após a terceira dose, este fato pode estar relacionado com a sustentação dos níveis maiores de IgG e IgA, o que pode ocorrer através do processo de *switching* de classes, onde no decorrer da maturação da resposta imunológica, por rearranjos gênicos, as células B passam a produzir anticorpos mais específicos e com maior afinidade como IgA e IgG (CERUTTI, A., 2008).

O resultado das subclasses de IgG mostraram padrões semelhantes entre os grupos, porém os animais imunizados via parenteral apresentaram os maiores níveis em todos os tipos de subclasses. Quando analisamos a rota oral de imunização, notamos que a produção de subclasses de IgG, apesar de presente, apresentou níveis mais baixos, mas a diferença está apenas na intensidade e não na proporção das subclasses. Este fator está relacionado com a via de estimulação onde imunizações sistêmicas refletem um maior sinal sérico quando comparado com uma estimulação na mucosa intestinal. Outro fato observado é a baixa produção de IgG2a pelos animais C57Bl/6j, isso segue características próprias desta linhagem que apresenta deficiência no gene que controla a produção dessa subclasse (MARTIN & LEW, 1998; MORGADO *et al.*, 1989), porém, podemos perceber

claramente que a resposta tipo Th1 é mais intensa nos animais C57BL/6j, ao passo que nos animais BALB/c a resposta tende para um balanço entre Th1/Th2. Caracteristicamente os animais C57Bl/6j apresentam uma resposta tipo Th1 e os animais BALB/c apresentam uma resposta basal voltada para o tipo Th2 (PINCHUK *et al.*, 2008), com isso podemos notar que após o processo de imunização, os animais do tipo BALB/c, adquirem um perfil voltado preferencialmente para uma resposta Th1, mas ainda mantendo níveis aumentados de IgG1. Este tipo de perfil também foi encontrado em estudos de imunização utilizando vacina de DNA (AMA1) onde os camundongos apresentaram, após imunização, um balanço na resposta Th1/Th2, sendo encontrado em animais BALB/c, os melhores índices de proteção na fase aguda (DAUTU *et al.*, 2007).

Avaliando a maturação dos anticorpos IgG no soros dos animais imunizados, notamos que em todos os grupos, os anticorpos encontrados foram de baixa avidéz, porém os níveis foram iguais ou superiores aos animais infectados agudamente com cistos de ME49. Este fato deve estar relacionado ao tempo da maturação da resposta imune em camundongos. Nosso ensaio foi realizado após 6 semanas, o que deve ter dificultado a obtenção de maiores índices de avidéz, já que em outros modelos, utilizando a maturação de vírus, os índices de avidéz demoram meses para atingir níveis como os da infecção natural (SOUZA *et al.*, 1997). Alguns autores descrevem índices de avidéz iguais ou superiores a 40%, por volta da décima semana do início da imunização (CHEN *et al.*, 2003a). As reações de avidéz apresentaram difícil padronização dada a qualidade de antígeno e o tipo e concentração do caotrópico utilizado, dificultando comparações entre dados de autores diferentes (HEDMAN *et al.*, 1989) Podemos notar também que apesar da imunização oral apresentar menores níveis de IgG no soro, esses anticorpos

apresentaram índices de avidéz consideráveis quando comparamos com os níveis encontrados na fase aguda da doença. Isto pode ser explicado pelo tipo de imunização utilizado, já que em geral, os índices de avidéz são determinados em vacinas vivas atenuadas, que simulam os resultados de uma infecção natural e não para antígenos com apresentação cíclica, como os utilizados em nossos modelos.

Na infecção natural, *T. gondii* é normalmente adquirido por ingestão de cistos ou oocistos, proporcionando assim uma importante fonte de estímulo sistêmico e principalmente na mucosa, por esse motivo é muito importante saber o verdadeiro papel das imunoglobulinas no bloqueio inicial da infecção. No estudo das imunoglobulinas excretadas/secretadas, na mucosa intestinal, podemos observar que apenas o grupo C57Bl/6j (i.p) apresentou os menores níveis de produção dos três tipos de imunoglobulinas nas fezes, todos os demais grupos apresentaram altos níveis de produção, em especial as classes IgG e S-IgA.

Níveis significativos de IgG já haviam sido observados por outros autores em estudos utilizando imunizações orais com antígenos sonicados em associação com toxina colérica (BOURGUIN *et al.*, 1991) e essa imunoglobulina, em conjunto com S-IgA, produzidas em intestinos de gatos infectados, atuaram na diminuição da penetração de *T. gondii* em fibroblastos, demonstrando a importância da IgG fecal na prevenção da infecção (OMATA *et al.*, 1997). Como já havia sido comprovado os anticorpos IgA anti-*T. gondii* secretados no leite demonstraram ser muito eficientes na proteção contra a toxoplasmose quando o desafio ocorre de forma natural, por via oral (McLEOD & MACK, 1986). Os mesmos autores também conseguiram comprovar que a S-IgA, diminui a infecção de enterócitos em 75% “*in vitro*” (MACK & McLEOD, 1992), demonstrando mais uma vez a importância dessa imunoglobulina no bloqueio da invasão do *T. gondii*, nas células intestinais. Os níveis de S-IgM são

substancialmente menores que a S-IgA, pela dificuldade de transporte da IgM, essa imunoglobulina apresenta normalmente uma produção menor nas mucosas de maneira geral. Além disso, a S-IgM não pode substituir totalmente S-IgA em termos funcionais, devido à sua maior sensibilidade às enzimas proteolíticas, e sua capacidade de ativar, em nível tecidual, a cascata de complemento com potenciais danos colaterais. Interessante notar que em pacientes deficientes em IgA, a IgM pode substituir aquela imunoglobulina em suas funções secretoras na mucosa (NORHAGEN, et al., 1989) Apesar da baixa afinidade, anticorpos de mucosa do isotipo IgA e IgM exibem alta avidéz devido a vários sítios de ligações com antígenos (quatro para dímeros de IgA e 10 para pentâmeros de IgM) resultando no reforço da sua capacidade de interagir com antígenos inertes e para neutralizar biologicamente antígenos ativos, sendo desta forma duas imunoglobulinas importantes na proteção local contra patógenos (WOOF & MESTECKY, 2005).

Para o estudo da expressão gênica de citocinas esplênicas dos animais imunizados, realizamos a avaliação através do real-time PCR. Podemos notar uma diferença na expressão de citocinas entre os grupos, com um aumento significativo de IFN- γ e IL-10 nos grupos imunizados por via intraperitoneal. IL-10 já demonstrou ter um papel importante no controle da morte de animais infectados com *T. gondii* ou *T. cruzi*, onde nesses modelos, apesar do controle da infecção, a morte é causada pelo aumento descontrolado na produção de citocinas pró-inflamatórias. Em células animais, células efetoras Th1 produzem IL-10 como meio de prevenção de danos colaterais, como um mecanismo de autocontrole, porém esse mecanismo também pode ser utilizado como escape por agentes patogênicos (TRINCHIERI, 2007). Embora em células humanas a polarização extrema da resposta tipo Th1, junto da presença de altos níveis de IL-12, induzirem o aumento dos níveis de IL-10 e IFN- γ

(GEROSA *et al.*, 1996), em animais a IL-12 não apresenta esse papel em células Th1 de camundongos infectados por *T. gondii*, onde o próprio parasita durante a infecção, controla a expressão de IL-10 (TRINCHIERI, 2007). Apesar do aumento de IFN- γ nos animais imunizados por via oral, não foi possível observar o mesmo efeito de aumento da IL-10 em células esplênicas.

A expressão dessas citocinas na mucosa intestinal apresentou um comportamento distinto do apresentado pelas células esplênicas. Na estimulação das placas de Peyer, podemos notar que não houve uma produção tão intensa de IFN- γ . Isto pode ser devido a diferentes populações celulares encontradas nestas placas, quando comparadas ao baço. As populações celulares intestinais estão em parte envolvidas com a tolerância aos antígenos, quer seja por alteração na apresentação de antígeno por células dendríticas profissionais (FARIA & WEINER, 2005) quer pela presença maior de subpopulações linfocíticas com receptores tipo $\gamma\sigma$, envolvidos em mecanismos de tolerância imunológica (MOWAT, 2003). A maior produção local de IL-10 em animais imunizados lembra este mecanismo de controle da imunidade, já que esta seria uma das principais citocinas envolvidas na indução de tolerância (MOWAT, 2003), mas é interessante notar que a produção foi mais intensa nos modelos de imunização parenteral. Nas células linfóides intestinais estimuladas a produção de IFN- γ foi muito menos marcante que nas células esplênicas, sugerindo que a população que foi estimulada não pertencia ao grupo CD8 de citotoxicidade clássico (DEROUIN, 1992), talvez envolvida com a produção local de plasmócitos e resposta do tipo Th2, evidenciada pela maior produção de anticorpos IgA e IgM para excreção nas fezes.

Analisando as respostas em conjunto, podemos sugerir que uma imunização parenteral resulta numa resposta imune voltada para proteger o hospedeiro contra

agressores que já invadiram o sistema, pela produção de células CD8 e produção maciça de IFN- γ ativador de macrófagos. Já a resposta imune induzida pela imunização oral também induz esta resposta em baço, embora de menor intensidade, mas também induz uma imunidade intestinal voltada para a produção de citocinas de proliferação como a IL-2, que indica a produção de células para a resposta efetora como linfócitos B para produção de anticorpos ou células CD8 $\alpha\alpha$ especializadas na migração luminal e combate externo ao agente. Estas células CD8 $\alpha\alpha$ não estão relacionadas com produção de interferon na produção de imunidade efetora em infecções semelhantes (FRANCO *et al.*, 1997) e tem sido uma difícil tarefa elucidar sua função (JIANG *et al.*, 2008), embora seja a célula CD8 mais produzida do organismo e muito efetiva (ROCHA, 2007).

Quando submetemos os diferentes grupos de animais imunizados aos esquemas de desafio com a cepa ME49 de *T. gondii*, notamos que em todos os grupos houve uma proteção significativa em relação ao grupo controle. Em todos os esquemas vacinais, o nível de resposta foi muito próximo dos já encontrados anteriormente por nós, utilizando camundongos C57Bl/6j, tanto quando imunizados i.p ou via oral (HIRAMOTO *et al.*, 2002; GALISTEO Jr. *et al.*, 2005). Porém, os camundongos BALB/c foram os que apresentaram níveis mais elevados de proteção, com diminuição contra a formação de cistos, em cerca de 80% dos animais após o desafio com a cepa ME49, chegando a não detectarmos cistos por microscopia convencional, na maioria dos casos. Imunizações utilizando uma mistura de 3 adenovírus modificados, que expressam proteínas de superfície de *T. gondii* (SAGs), apresentaram uma redução de 80% da carga parasitária de cistos após o desafio com a cepa P-Br, porém não foi observado a ausência de cistos em nenhum dos animais avaliados (CAETANO *et al.*, 2006). Além dos animais BALB/c

apresentarem naturalmente uma resistência genética aos cistos de ME49 (SUZUKI *et al.*, 1995), provavelmente essa maior proteção esteja relacionada ao fato destes apresentarem uma resposta mais voltada para um balanço entre Th1/Th2, influenciada por uma maior produção de IL-10 (HSIEH *et al.*, 1995) e por apresentarem também uma maior produção de IgG e S-IgA nas fezes, promovendo assim condições mais favoráveis para uma melhor proteção da mucosa intestinal.

Animais com deficiência de IFN- γ foram submetidos à imunização com os parasitas irradiados, por via oral e intraperitoneal. Podemos observar que não houve nenhuma morte ou evidência da doença, em nenhum grupo, durante o processo de imunização. Animais com deficiência na produção de IFN- γ , não produzem uma resposta sistêmica completa e efetiva contra o *T. gondii*, fato que leva os mesmos a morte em no máximo 10 dias após serem infectados com cistos de ME49 (CARMO, 2006). Diversos autores demonstraram que apenas um parasita viável é capaz de instalar a infecção, levando os camundongos a morte após alguns dias. Em nossos achados, os animais IFN- $\gamma^{-/-}$ sobreviveram por 45 dias, durante todo período da imunização, sem qualquer comprometimento ou óbito de nenhum animal. Esses resultados demonstram que nosso preparado vacinal apresenta excelente nível de segurança, podendo ser utilizado como imunógeno em animais.

Após o período de imunização podemos notar uma produção efetiva de anticorpos no soro e nas fezes de todos os grupos estudados, mostrando que mesmo na ausência de IFN- γ , os animais conseguiram produzir uma resposta humoral contra nosso imunógeno. Fato semelhante foi observado em modelos utilizando imunizações com esporozoítos atenuados geneticamente de *P. berghei* em camundongos C67Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$, onde houve a produção de uma resposta específica de anticorpos (MUELLER *et al.*, 2007). Após o período de imunização, os

animais receberam o desafio oral com cistos da cepa ME49 e em ambos os grupos notamos um aumento na sobrevivência dos animais, chegando a uma proteção de 20% (n=4). Nesses animais sobreviventes, foi possível observar, a presença de cistos cerebrais, sendo em maior quantidade, nos animais imunizados por via oral. Nossos dados sugerem que em animais deficientes de IFN- γ , após imunização prévia, a proteção foi provavelmente sustentada por anticorpos específicos presentes no soro e nas fezes, no entanto sua eficiência parece ser limitada, pelo fato desses animais não ficarem protegidos contra a formação de cistos cerebrais.

Como já relatado por outros autores o IFN- γ tem um importante papel na proteção da infecção e controle da proliferação do *T. gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1994), mas outros fatores podem estar presentes, evidenciado na ausência dessa quimiocina. Alguns autores reportam que a resistência em camundongos deficientes de IFN- γ , seja dada através da via CD40-CD154, onde ocorre o favorecimento da ativação de células apresentadoras de antígeno e ativação de células T CD4+ e CD8+, como um importante papel na resposta imunológica a patógenos intracelulares (SUBAUSTE & WESSENDARP, 2006). Nossos dados de anticorpos mostram que a produção de S-IgA e S-IgM foi maior nestes animais, o que corrobora esta afirmação, relacionada ao efeito de células T reguladoras, que dependem de IFN- γ para sua ação.

Interessante notar que, pelos resultados por nós obtidos, a resposta celular apresenta um papel muito importante no controle da infecção e na diminuição da formação de cistos, porém vale ressaltar a importância da resposta humoral, tanto sérica e principalmente a intestinal, no combate inicial do bloqueio da invasão do parasita no hospedeiro. Esses dados sugerem que esse tipo de abordagem favorece muito imunização de felinos, pois podemos iniciar o combate da infecção já no

momento da ingestão dos parasitas por esses animais, impedindo assim a aquisição da infecção e num segundo momento à eliminação de oocistos na natureza. Além do mais, combate preventivo contra o parasita, impedindo que ele através de mecanismos de escape se instale no hospedeiro, parece ser a forma de maior sucesso contra a instalação da infecção no hospedeiro até o momento.

O uso de parasitas viáveis, mas bloqueados em seu mecanismo de reprodução, favorece a apresentação correta dos antígenos e deixa a abordagem a mais próxima da forma natural da infecção, que induz proteção eficiente em imunocompetentes, pelo menos quanto ao desenvolvimento de doença (HIRAMOTO *et al.*, 2002, REMINGTON *et al.*, 2005). Outro fator adicional é o uso da radiação ionizante, que age diretamente nas proteínas, promovendo a oxidação e tornando-as mais facilmente captadas por macrófagos, através de receptores scavengers específicos, aumentando sua imunogenicidade (PINHO *et al.*, 1995; CARDI *et al.*, 1998).

Outro aspecto pouco levantado em anos recentes é a eficiência da radiação ionizante como ferramenta na produção de parasitas viáveis, mas sem capacidade de reprodução, em especial para parasitas mais complexos, com divisão sexuada, como protozoários do filo Apicomplexa (HIRAMOTO *et al.*, 2002; NUSSENZWEIG *et al.*, 1969) e helmintos (WALES & KUSEL, 1992), ideais para vacinas. Helmintos produzem uma imunidade concomitante, impedindo novas infestações após a instalação de um parasita em um hospedeiro. Esta imunidade é a ideal para prevenir novas infestações e tem sido proposta com sucesso em esquistossomose (McMANUS & LOUKAS, 2008). A ciência não deve esquecer os potenciais de processos preconceitualmente considerados como perigosos e o uso cada vez maior da radiação na esterilização de materiais para uso humano e alimentos mostra

este aspecto. A radiação é uma ferramenta poderosa e perigosa, mas temer não significa não estudar ou usar, se não ainda estaríamos sem utilizar o fogo, que queima. O estudo, e o uso criterioso, da radiação ionizante em agentes biológicos podem resultar em inúmeras formas de produção de insumos úteis para a humanidade. Cabe apenas a nós prover o conhecimento para este uso seguro da radiação e não compartilhar do temor visceral do desconhecido.

Quando pensamos em animais com carne de consumo humano, como suínos e ovinos, as formas de controle da infecção estão relacionadas com as boas práticas de manejo, como controle de roedores e felinos nas instalações, educação sanitária e vacinação. O desenvolvimento de uma vacina para imunização desses animais, principalmente de felinos domésticos e selvagens, é a estratégia de controle que tem como objetivo reduzir as perdas econômicas em animais de produção e o número de cistos teciduais na carne destes animais. Dessa forma, pode-se diminuir o risco de infecção ao homem pela ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida de animais infectados e ainda prevenindo a eliminação de oocistos pelos felídeos. Tentativas utilizando uma cepa termo-sensível de *T. gondii* (ts-4), demonstrou que animais imunizados e desafiados com a cepa M-7741, apresentaram uma sobrevida de 88%, porém não se tem relatos da determinação do número de cistos e o grau de lesão no cérebro desses animais (WALDELAND *et al.*, 1983). Estudos apontam que a imunização com esse tipo de cepa apresentou alta virulência em animais jovens, o que dificulta seu uso como vacina, por perdas fetais e em animais jovens de diferentes espécies (PINCKNEY *et al.*, 1995; JUNGENSEN *et al.*, 2001). Atualmente a única vacina comercialmente utilizada é a Toxovax[®], produzida a partir de parasitas da cepa S48, isolada de membranas fetais de um aborto ovino e, após 3.000 passagens em camundongos, perdeu a sua habilidade de desenvolver cistos

teciduais. Esta vacina viva é amplamente utilizada no Reino Unido e Nova Zelândia, prevenindo o abortamento ovino e garantindo uma proteção durante 18 meses, mas se recomenda a revacinação anual (BUXTON, 1993). Porém a utilização dessa vacinas apresenta problemas de logística, como transporte e conservação das amostras. O uso limitado da Toxovax[®] deve-se ao fato da necessidade de imunização imediata de todo o rebanho no momento da chegada das amostras, o que passa a ser inviável sua utilização e manipulação em outros países.

Outro fator importante é a questão do comprometimento ocular causado pela toxoplasmose. O grau de lesão e seu comprometimento variam muito de acordo com a região atingida. Em estudos realizados por nosso grupo, podemos observar que hamsters, previamente imunizados com taquizoítos irradiados, foram eficientes na prevenção do comprometimento ocular, com diminuição de focos de lesões na retina de animais desafiados (CURSINO, 2007), sugerindo que uma vacina sem cistos não induzirá no futuro lesões de imunidade cruzada ocular.

Além de todos os problemas causados pela toxoplasmose e aqui levantados, existem estudos que sugerem que a infecção pelo *T. gondii* pode promover alteração no comportamento do hospedeiro infectado. Diversos trabalhos, com populações humanas, já demonstraram alterações comportamentais entre grupos soro positivos para o *T. gondii* entre grupos controles negativos, como maior incidência de acidentes de trânsito e alteração de personalidade (FLEGR, 2007; FLEGR *et al.*, 1996). O mesmo estudo também já foi realizado em animais, onde foi possível observar modificação da ansiedade e processo cognitivo (WEBSTER, 2007), o que os torna mais suscetíveis aos predadores (LAMBERTON *et al.*, 2008). Se confirmados, esses dados podem transformar a toxoplasmose em um grande problema de saúde pública no futuro, mas impedindo o uso de uma vacina humana,

pois será necessário esclarecer o mecanismo de desencadeamento destas alterações de comportamento antes de permitir o uso de vacina em humanos.

Estudos realizados nos Estados Unidos, utilizando gatos vacinados com bradizoítos livres da cepa mutante T-263, reduziram a exposição do *T. gondii* em suínos, demonstrando a importância da vacinação dos gatos na prevenção da transmissão da doença (MATEUS-PINILLA *et al.*, 1999). A interrupção da cadeia de transmissão para animais de produção, em geral herbívoros e dependentes da ingestão de oocistos produzidos por gatos, seria a melhor forma de evitar a toxoplasmose humana. Esta seria bloqueada sem evitar a ingestão de carne que não pode ser evitada por problemas nutricionais e também ocorreria uma diminuição progressiva da contaminação de águas potáveis, pela menor disponibilidade de oocistos produzidos por felinos livres. O tratamento da água em grandes cidades envolve processos de decantação e sedimentação, mas os oocistos são flutuantes e não são sensíveis a cloração habitual das águas, mais voltada para agentes virais e bacterianos (GAJADHAR *et al.*, 2006; SMITH & NICHOLS, 2006).

Todos estes dados mostram a aplicação prática de desenvolvimento de uma vacina oral para toxoplasmose para uso em felinos. Esta vacina poderia ser utilizada como iscas atrativas para os gatos livres do ambiente, como os de rua ou de vida livre selvagem, promovendo uma diminuição da excreção de oocistos por eles e assim reduzindo a transmissão ambiental da toxoplasmose, sem os riscos de intervenção direta nas populações humanas. No caso de animais carnívoros o uso de iscas como veículo para distribuição de imunógenos vem sendo utilizada com sucesso há alguns anos na vacinação da raiva (RABORAL VR-G[®]). Esta vacina produzida nos Estados Unidos utiliza um vetor viral recombinante e farinha de peixe ou comida para cão como veículos. Estas iscas são distribuídas em grandes áreas

para a imunização de cães, gatos, raposas entre outros animais com efetiva segurança e resultados eficazes, contribuindo com o controle da raiva em muitos países (MACKOWIAK *et al.*, 1999). Porém vale ressaltar que esse tipo de abordagem não favorece animais ruminantes, por apresentarem um sistema digestivo compartimentado, sendo a imunização intranasal uma alternativa para imunização de mucosas nesses modelos.

Estudos de conservação do parasita e distribuição das vacinas no ambiente devem ser realizados com o objetivo de atingir o maior número de animais selvagens, que seguramente em médio prazo, será responsável pela interrupção do ciclo da doença e conseqüentemente uma melhoria na qualidade de vida das populações, reduzindo a transmissão ambiental e perdas econômicas.

VI CONCLUSÕES

Geral

Nossos resultados mostraram que a imunização, com taquizoítos irradiados a 255 Gy, induziu resposta imune protetora em camundongos, com produção de citocinas e anticorpos, com participação do IFN- γ na proteção a infecção.

Especificamente, quanto ao uso de imunização oral com taquizoítos de *T. gondii* irradiados.

A funcionalidade celular do parasita irradiado é mantida no processo de vacinação oral, mesmo após a ação das enzimas estomacais, com invasão dos enterócitos e subsequente morte do parasita.

Há sempre produção significativa de IgG sérica específica após imunização oral, embora em níveis inferiores ao da imunização parenteral.

Houve sempre produção significativa de anticorpos IgA específicos no soro de camundongos imunizados por via oral, sendo semelhante ou maior que a imunização parenteral.

Houve menor produção de IgM sérica após imunização por via oral nos modelos estudados, diferentemente do que ocorreu na imunização parenteral.

A IgG2b foi a subclasse mais produzida de IgG após imunização oral, semelhante a imunização parenteral.

A maturação da avidéz de IgG foi mais lenta na imunização por via oral que na imunização parenteral.

Houve excreção de IgG, IgA e IgM nas fezes dos animais imunizados por via oral, em geral mais intensa que em animais imunizados por via parenteral.

Na imunidade celular envolvida na imunização por via oral, houve um aumento na produção de IFN- γ por células esplênicas, com níveis menores de produção de IL-2, IL-10 e IL-4.

Na imunidade celular intestinal em animais imunizados por via oral, houve padrão diferente de produção de citocinas, com menor produção de IFN- γ e produção maior de IL-2.

Os animais imunizados e desafiados com agentes viáveis apresentaram proteção significativa com diminuição de número de cistos cerebrais, em especial os animais BALB/c.

Por estudos em animais geneticamente deficientes de IFN- γ , a vacinação oral induz uma proteção parcial com maior número de cistos cerebrais e maior tempo de sobrevivência dos animais.

Houve produção de IgG e IgA específicos no soro dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$, sugerindo participação destes anticorpos na proteção parcial utilizada.

Houve excreção de IgA e IgM nas fezes de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados.

VII – REFERÊNCIAS

- ANTUNES, C.M.F., KATZ, N., ANDRADE, R.M., NETO, E.M. & LIMA, J.M. Study of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 13: 383-386, 1971.
- ARAUJO, F.G. Immunization against *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Today.**, 10(9): 358-360, 1994.
- BAKAL, P.M. & VELD, N. Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strain RH. **Z. Parasitenkd.**, 59(3): 211-217, 1979.
- BAPTISTA, J.A., SPENCER, P.J., OLIVEIRA, J.E., CASARE, M.S. & NASCIMENTO, N. Immune response against antigens irradiated with ⁶⁰Co gamma-rays. **J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry.**, 269(3): 565-569, 2006.
- BEAMAN, M.H., WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S. Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. **Immunol.**, 127:97-117, 1992.
- BERDOY, M., WEBSTER, J.P. & MACDONALD, D.W. Parasite-altered behaviour: is effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific?. **Parasitology**, 111(Pt 4): 403-409, 1995.
- BOHNE, W., HEESEMANN, J. & GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infect. Immun.**, 61(3): 1141-1145, 1993.
- BÓIA, M.N., CARVALHO-COSTA, F.A., SODRÉ, F.C., PINTO, G.M. & AMENDOEIRA, M.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, 50(1): 17-20, 2008.

- BOOTH, K.S.; JAMES, E.R.; POPIEL, I. Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Cryobiology**, 33(3): 330-337, 1996.
- BOURGUIN, I., CHARDÈS, T. & BOUT D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57Bl/6 mice. **Infect. Immun.**, 61(5): 2082-2088, 1993.
- BOURGUIN, I., CHARDES, T., MEVELEC, M.N., WOODMAN, J.P. & BOUT, D. Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using cholera toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, 65(3): 265-271, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 7(72): 248-254, 1976.
- BRAYDEN, D.J., JEPSON, M.A. & BAIRD, A.W. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. **Drug Discov. Today.**, 10(17): 1145-1157, 2005.
- BUTLER, J., LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. **Radiat. Phys. Chem.**, 24(3-4): 273-282, 1984.
- BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitol.Today.**, 9(9): 335-337, 1993.
- BUZONI-GATEL, D., SCHULTHESS, J., MENARD, L.C. & KASPER, L.H. Mucosal defence against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cell. Microbiol.**, 8(4): 535-544, 2006.

- BUZONI-GATEL, D., LEPAGE, A.C., DIMIER-POISSON, I.H., BOUT, D.T. & KASPER, L.H. (1997). Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, 158(12): 5883-5889, 1997.
- CAETANO, B.C., BRUNA-ROMERO, O., FUX, B., MENDES, E.A., PENIDO, M.L. & GAZZINELLI, R.T. Vaccination with Replication-Deficient Recombinant Adenoviruses Encoding the Main Surface Antigens of *Toxoplasma gondii* Induces Immune Response and Protection Against Infection in Mice. **Hum. Gene Ther.**, 17(4): 415-426, 2006.
- CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W., MINEO, J.R., TAKIGUTI, C.K. & NAKAHARA, O.S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infect. Immun.**, 21: 55-58, 1978.
- CARDI, B.A., NASCIMENTO, N., ANDRADE Jr, H.F. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. **Int. J. Radiat. Biol.**, 7(5): 557-564, 1998.
- CARMO, C.V. Avaliação da formação *in vitro* de cistos de cepas de *Toxoplasma gondii* com diferentes perfis genéticos induzidos por temperatura. 2006. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nat. Rev. Immunol.**,8(6): 421-434, 2008.
- CHA, D.Y., SONG, I.K., LEE, G.S., HWANG, O.S., NOH, H.J., YEO, S.D., SHIN, D.W. & Lee, Y.H. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. **Korean J. Parasitol.**, 39: 233-240, 2001.

- CHEN, M., MUN, H.S., PIAO, L.X., AOSAI, F., NOROSE, K., MOHAMED, R.M., BELAL, U.S., FANG, H., AHMED, A.K., KANG, H.K., MATSUZAKI, G., KITAMURA, D. & YANO, A. Induction of protective immunity by primed B-1 cells in *Toxoplasma gondii* – infected B cell-deficient mice. **Microbiol. Immunol.**, 47: 997-1003, 2003a.
- CHEN, M., AOSAI, F., NOROSE, K., MUN, H.S., YANO, A. The role of anti-HSP70 autoantibody-forming V(H)1-J(H)1 B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Int. Immunol.**, 15(1): 39-47, 2003b.
- CLARK, J.D. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
- CLUMECK, N., SONNET, J., Taelman, H., MASCART-LEMONE, F., DE BRUYERE, M., VANDEPERRE, P., DASNOY, J., MARCELIS, L., LAMY, M., JONAS, C. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. **N. Engl. J. Med.**, 310(8): 492-497, 1984.
- COLLAZO, C.M., YAP, G.S., SEMPOWSKI, G.D., LUSBY, K.C., TESSAROLLO, L., WOUDE, G.F., SHER, A. & TAYLOR, G.A. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. **J. Exp. Med.**, 194: 181-188, 2001.
- COUPER, K.N., ROBERTS, C.W., BROMBACHER, F., ALEXANDER, J. & JOHNSON, L.L. *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. **Infect Immun.**, 73(12): 8060-8068, 2005.
- COUSINS, D.J., LEE, T.H. & STAYNOV, D.Z. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. **J. Immunol.**, 169(5): 2498-2506, 2002.

- COUTO, W.J., BRANCO, J.N.R., ALMEIDA, D., CARVALHO, A.C., VICK, R., TELES, C.A., AGUIAR, L.F. & BUFFOLO, E. (2001). Transplante cardíaco e infecção. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, 16: 141-151.
- CRIPPS, A.W., KYD, J.M. & FOXWELL, A.R. Vaccines and mucosal immunization. **Vaccine** 19: 2513-2515, 2001.
- CURSINO, S.R.T. Evidências sorológicas e experimentais da resposta autoimune humoral contra retina em uveítes causadas por *Toxoplasma gondii*. 2007. Tese. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DAGHER, R. & LUCAS, K. Toxoplasmosis in the patients with cancer. **Infect. Med.**, 13: 998-1000, 1996.
- DAUTU, G., MUNYAKA, B., CARMEN, G., ZHANG, G., OMATA, Y., XUENAN, X., IGARASHI, M. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. **Exp. Parasitol.**, 116(3): 273-282, 2007.
- DENKERS, E.Y., BUTCHER, B.A., DEL RIO, L. & BENNOUNA, S. (2004). Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. **Int. J. Parasitol.**, 34: 411-421, 2004.
- DEROUIN, F. Pathogeny and immunological control of toxoplasmosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 25(12): 1163-1169, 1992.
- DUARTE, M.I.S. & ANDRADE JR., H.F. Toxoplasmose. In: Brasileiro Fo, G., Pitella, J.E.H., Pereira, F.E.L., Bambirra, E.A. & Barbosa, A.I.A. (eds). Bogliolo Patologia, 7ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 1373-1380, 2006.

- DUARTE, M.I., MARIANO, O.N., TAKAKURA, C.F., EVERSON, D. & CORBETT, C.E. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. **Ultrastruct. Pathol.**, 16(4): 475-482, 1992.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. & SPEER, C.A. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11 (2): 267-299, 1998a.
- DUBEY, J.P.; THAYER, D.W.; SPEER, C.A.; SHEN, S.K. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. **Int. J. Parasitol.**, 28(3): 369-375, 1998b.
- DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Vet. Parasitol.**, 64: 65-70, 1996a.
- DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; THAYER, D.W.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. **J. Parasitol.**, 82(5): 724-727, 1996b.
- DUBEY, J.P. BRAKE, R.J., MURRELL, K.D. & FAYER, R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **Am. J. Vet. Res.**, 47(3): 518-522, 1986.
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*, **J. Parasitol.**, 56: 447-456, 1970.
- EGAN, J.E., HOFFMAN, S.L., HAYNES, J.D., SADOFF, J.C., SCHNEIDER, I., GRAU, G.E., HOLLINGDALE, M.R., BALLOU, W.R. & GORDON, D.M. Humoral immune response in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 49: 166-173, 1993.

- ERICKSON, M.C & ORTEGA, Y.R. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. **J. Food Prot.**, 69(11):2786-808, 2006.
- FAGARASAN, S. & HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. **Nat. Rev. Immunol.**,3(1): 63-72.
- FARIA, A.M. & WEINER, H.L. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, 206: 232-259, 2005.
- FLEGR, J. Effects of toxoplasma on human behavior. **Schizophr. Bull.**, 33(3): 757-760, 2007.
- FLEGR, J., ZITKOVÁ, S., KODYM, P. & FRYNTA, D. Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, 113(Pt 1): 49-54, 1996.
- FRANCO, M.A., TIN, C., ROTT, L.S., VANCOTT, J.L., MCGHEE, J.R. & GREENBERG, H.B. Evidence for CD8+ T-cell immunity to murine rotavirus in the absence of perforin, fas, and gamma interferon. **J. Virol.**, 71(1): 479-846, 1997.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. & MILLER, N.Y. *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. **Science**, 164: 432-433, 1969.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. & MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, 167(919): 893-896, 1970.
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCÓN, J., CASTELLS, D., CORREA, O. & CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Vet. Parasitol.**, 81(1): 85-88, 1999.

- GADDI, P.J. & YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol.*, 85(2): 155-159, 2007.
- GAJADHAR, A.A., SCANDRETT, W.B. & FORBES, L.B. Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. *Rev. Sci. Tech.*, 25(2): 595-606, 2006.
- GALISTEO JR., A.J., HIRAMOTO, R.M., CARMO, C.V., ALVES, J.B., ANDRADE JR., H.F. 255Gy irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* induce intestinal immune response in C57Bl/6j mice immunized by oral route. **The International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2005)**. Santos –SP, 2005.
- GARCIA, J.S., NAVARRO, I.T., OGAWA, L., OLIVEIRA, R.C., GARCIA, S.M.F. & LEITE, J. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32(6): 671-676, 1999.
- GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E.Y., HIENY, S., CASPAR, P., TRINCHIERI, G. & SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 153(6): 2533-2543, 1994.
- GEROSA, F., PAGANIN, C., PERITT, D., PAIOLA, F., SCUPOLI, M.T., ASTE-AMEZAGA, M., FRANK, I., TRINCHIERI, G. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J. Exp. Med.* 183(6): 2559-2569, 1996.
- GILBERT, J.M., FULLER, A.L., SCOTT, T.C. & McDOUGALD, L.R. Biological effects of gamma-irradiation on laboratory and field isolates of *Eimeria tenella* (Protozoa; Coccidia). *Parasitol. Res.*, 84: 437-441, 1998.

- GLASNER, P.D., SILVEIRA, C., KRUSZON-MORAN, D., MARTINS, M.C., BURNIER JUNIOR, M., SILVEIRA, S., CAMARGO, M.E., NUSSENBLATT, R.B., KASLOW, R.A. & BELFORT JUNIOR, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **Am. J. Ophthalmol.**, 114(2): 136-144, 1992.
- GODARD, I., DARCY, F., DESLEE, D., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: Kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. **Infect. Immun.**, 58(8): 2446-2451, 1990.
- GOTTSTEIN, B. *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, 65 (Suppl): 89S-95S, 1995.
- GRAS, L., WALLON, M., POLLAK, A., CORTINA-BORJA, M., EVENGARD, B., HAYDE, M., PETERSEN, E., GILBERT, R. & European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. **Acta Paediatr.**, 94(12): 1721-1731, 2005.
- GROSH, D.S. & HOOPYWOOD, L.E. Biological effects of radiation. 2th ed. New York, Academic Press, 1979.
- GUIMARÃES, A.C.S., KAWARABAY, M., BORGES, M.M., TOLEZANO, J.E. & ANDRADE JR, H.F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 35(6): 479-483, 1993.
- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A. Radiation-induced signal transduction and stress response. **Radiat. Res.**, 150(Suppl 5): S102-108, 1998.

- HAVLICEK, J., GASOVA, Z.G., SMITH, A.P., ZVARA, K. & FLEGR, J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. **Parasitology**, 122(Pt 5): 515-520, 2001.
- HEDMAN, K., LAPPALAINEN, M., SEPPÄÄIÄ, I. & MÄKELÄ, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.**, 159(4):736-40, 1989.
- HEGAB, S.M. & AI-MUTAWA, A.S. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clin. Exp. Med.**, 3(2): 84-105, 2003.
- HIRAMOTO, R.M., GALISTEO JR., A.J., DO NASCIMENTO, N. & ANDRADE JR., H.F. 200Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. **Vaccine**, 20(16): 2072-2081, 2002.
- HIRAMOTO, R.M., MAYBAURL-BORGES, M., GALISTEO JR., A.J., MEIRELES, L.R., MACRE, M.S. & ANDRADE JR., H.F. Infectivity of cysts of the ME49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Rev. Saude Publica**. 35(2):113-8, 2001.
- HOLMGREN, J. & CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat .Med.** 11(4 Suppl): S45-S53, 2005.
- HRDÁ, S., VOTYPKA, J., KODYM, P. & FLEGR, J. (2000). Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. **J. Parasitol.**, 86(4): 657-663, 2000.
- HSIEH, C., MACATONIA, S.E., O'GARRA, A. & MURPHY, K.M. (1995). T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*. **J. Exp. Med.**, 181(2): 713-721, 1995.

- HSU, H.W., GRADY, G.F., MAGUIRE, J.H., WEIBLEN, B.J. & HOFF, R. Newborn screening for congenital *Toxoplasma* infection: five years experience in Massachusetts, USA. **Scand. J. Infect. Dis.**, 84(suppl.): 59-64, 1992.
- HUDSON, L.; HAY, F.C. Practical Immunology. Oxford, p. 348-350, 1989.
- HUTCHISON, W.M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, 206: 961-962, 1965.
- IGARASHI, M., KANO, F., TAMEKUNI, K., MACHADO, R.Z., NAVARRO, I.T., VIDOTTO, O., VIDOTTO, M.C. & GARCIA, J.L. *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, 118(3): 386-392, 2008.
- ISRAELSKI, D.M. & REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clin. Infect. Dis.**, 17(suppl 2): S423-S435, 1993.
- JACOBS, L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. **Adv. Parasitol.**, 5: 1-45, 1967.
- JANKOVIC, D., SHER, A. & YAP, G. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. **Curr. Opin. Immunol.**, 13(4):403-409, 2001.
- JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of maula lutea in eye of normal dimensions, and microphthalmic eye, with parasites in the retina. **Cas. Lék. Cesk.**, 62: 1021-1027, 1923.
- JIANG, J.Q., HE, X.S., FENG, N., GREENBERG, H.B. Qualitative and quantitative characteristics of rotavirus-specific CD8 T cells vary depending on the route of infection. **J. Virol.**, 82(14): 6812-6819. Epub 2008 May 14, 2008.

- JUNGERSEN, G., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, L. & LIND, P. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. **J. Parasitol.**, 87(1): 108-113, 2001.
- KANG, H., REMINGTON, J.S. & SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. **J. Immunol.**, 164(5): 2629-2634, 2000.
- KAR, N. & MISRA, B. Toxoplasma seropositivity and depression: a case report. **BMC Psychiatry**, 4(1): 1, 2004.
- KASPER, L., COURRET, N., DARCHE, S., LUANGSAY, S., MENNECHET, F., MINNS, L., RACHINEL, N., RONET, C. & BUZONI-GATEL, D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Int. J. Parasitol.** 34(3): 401-409, 2004.
- KASPER, L.H. & BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. **Parasitol. Today**, 14: 150-156, 1998.
- KRAEHENBUHL, J.P. & NEUTRA, M.R. Epithelial M cells: differentiation and function. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, 16: 301-332, 2000
- LAMBERTON, P.H, DONNELLY, C.A. & WEBSTER, J.P. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. **Parasitology**, 14: 1-8, 2008.
- LANG, C., GROSS, U., LÜDER, C.G. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, 100(2): 191-203, 2006.
- LAROCQUE, R., NAKAGAKI, K., LEE, P., ABDUL-WAHID, A. & FAUBERT, G.M. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst

wall protein inhibits shedding of cysts. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. **Infect. Immun.**, 71(10): 5662-5669, 2003.

LEE, Y.H., SHIN, D.W., LEE, J.H., NAM, H.W. & AHN, M.H. Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. **Yonsei Med. J.**, 48(3): 396-404, 2007.

LEPAGE, A.C., BUZONI-GATEL, D., BOUT, D.T., KASPER, L.H. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 161(9): 4902-4908, 1998.

LI, T., TAKEDA, N., MIYAMURA, T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. **Vaccine** 19(25-26): 3476-3484, 2001.

LINDOVÁ, J., NOVOTNÁ, M., HAVLÍČEK, J., JOZÍFKOVÁ, E., SKALLOVÁ, A., KOLBEKOVÁ, P., HODNÝ, Z., KODYM, P. & FLEGR, J. Gender differences in behavioural changes induced by latent toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, 36(14): 1485-1492, 2006.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}. **Methods.** 25(4): 402-408, 2001.

LOPES, F.M., GONÇALVES, D.D., DOS REIS, C.R., BREGANÓ, R.M., FREIRE, R.L., DE FREITAS, J.C. & NAVARRO, I.T. Presence of domesticated cats and visual impairment associated to *Toxoplasma gondii* serum positive children at an elementary school in Jataizinho, state of Paraná, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 17(1): 12-15.

- LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S. Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, 15: 211-222, 1992.
- MACK, D.G. & McLEOD, R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. **J. Clin. Invest.** 90(6): 2585-2592, 1992.
- MACKOWIAK, M., MAKI, J., MOTES-KREIMEYER, L., HARBIN, T. & VAN KAMPEN, K. Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology. **Adv. Vet. Med.**, 41: 571-583, 1999.
- MAGNO, R.C., STRAKER, L.C., DE SOUZA, W. & ATTIAS, M. Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. **Microsc. Microanal.**, 11: 166-174, 2005.
- MARTIN R.M. & LEW A.M. Is IgG2a a good Th1 marker in mice?. **Immunol. Today.** 19(1): 49, 1998.
- MARTINEZ-SILVA, R., LÓPEZ, V.A., COLÓN, J.I. & CHIRIBOGA, J. *Trypanosoma cruzi*: effects of gamma radiation on growth and infectivity. **Exp. Parasitol.**, 25: 162-170, 1969.
- MARTINO, R., MAERTENS, J., BRETAGNE, S., ROVIRA, M., DECONINCK, E., ULLMANN, A.J., HELD, T. & CORDONNIER, C. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, 31(5): 1188-1194, 2000.
- MASCHKE, M., DIETRICH, U., PRUMBAUM, M., KASTRUP, O., TUROWSKI, B., SCHAEFER, U.W., DIENER, H.C. Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 23(11): 1167-1176, 1999.

- MATEUS-PINILLA, N.E., DUBEY, J.P., CHOROMANSKI, L. & WEIGEL, R.M. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. **J. Parasitol.**, 85(5): 855-860, 1999.
- MAYES, J.T., O'CONNOR, B.J., AVERY, R., CASTELLANI, W. & CAREY, W. Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, 21(3): 511-515, 1995.
- McCANNEL, C.A., HOLLAND, G.N., HELM, C.J., CORNELL, P.J., WINSTON, J.V. & RIMMER, T.G. Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. **Am. J. Ophthalmol.**, 121(1): 35-46, 1996.
- McLEOD, R. & MACK, D.G. Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 136(7): 2640-2643, 1986.
- McLEOD, R., EISENHAUER, P., MACK, D., BROWN, C., FILICE, G., SPITALNY, G. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, 142(9): 3247-3255, 1989.
- McMANUS, D.P. & LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin. Microbiol.**, 21(1): 225-242, 2008.
- MEIRELES, L.R., TSUTSUI, V.S., CARMO, C.V., GALISTEO Jr., A.J., HIRAMOTO, R.M., TERENTOWICZ, H.C.K. & ANDRADE Jr., H.F. Quantitative *Toxoplasma gondii* oocyst detection by a modified Kato Katz test using Kinyoun staining (KKK) in ME49 strain experimentally infected cats. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 50(3): 187-190, 2008.
- MEIRELES, L.R., GALISTEO JR., A.J., POMPEU, E. & de ANDRADE, H.F. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Trop. Med. Int. Health.**, 9(8):876-81, 2004.

- MEIRELES, L.R. Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo. 2001. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MICHAELS, H.B. & HUNT, J.W. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. **Radiat. Res.**, 74: 23-34, 1978.
- MICHAELS, M.G., WALD, E.R., FRICKER, F.J., DEL NIDO, P.J. & ARMITAGE, J. Toxoplasmosis in pediatric recipients of heart transplants. **Clin. Infect. Dis.**, 14: 847-851, 1992.
- MILLER, N.Y., FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. Oral infection with *Toxoplasma gondii* cysts and oocysts in felines, other mammals and in birds. **J. Parasitol.**, 58: 928-937, 1972.
- MORDUE, D.G., MONROY, F., La REGINA, M., DINARELLO, C.A. & SIBLEY, L.D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **J. Immunol.**, 167(8): 4574-4584, 2001.
- MORGADO, M.G., CAM, P., GRIS-LIEBE, C., CAZENAVE, P.A., JOUVIN-MARCHE, E. Further evidence that BALB/c and C57BL/6 gamma 2a genes originate from two distinct isotypes. **EMBO J.** 8(11):3245-51, 1989.
- MORRISON, W.I., BLACK, S.J., PARIS, J., HINSON, C.A. & WELLS, P.W. Protective immunity and specificity of antibody response elicited in cattle by irradiated *Trypanosoma brucei*. **Parasite Immunol.**, 4: 395-407, 1982.
- MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat. Rev. Immunol.**, 3(4): 331-341, 2003.

- MUELLER, A.K., DECKERT, M., HEISS, K., GOETZ, K., MATUSCHEWSKI, K., SCHLÜTER, D. Genetically attenuated *Plasmodium berghei* liver stages persist and elicit sterile protection primarily via CD8 T cells. **Am. J. Pathol.**, 171(1): 107-115, 2007.
- MURRAY, H. W. & COHN, Z.A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. **J. Exp. Med.**, 150: 938-949, 1979.
- NETO, E.C., ANETE, E., RUBIM, R., BRITES, A., SCHULTE, J., BECKER, D. & TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **Int. J. Epidemiol.**, 29(5): 941-947, 2000.
- NICKDEL, M.B., LYONS, R.E., ROBERTS, F., BROMBACHER, F., HUNTER, C.A., ALEXANDER, J. & Roberts, C.W. Intestinal pathology during acute toxoplasmosis is IL-4 dependent and unrelated to parasite burden. **Parasite Immunol.**, 26: 75-82, 2004.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondii. **C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.** 147: 763-766, 1908.
- NORHAGEN, G., ENGSTRÖM, P.E., HAMMARSTRÖM, L., SÖDER, P.O. & SMITH, C.I. Immunoglobulin levels in saliva in individuals with selective IgA deficiency: compensatory IgM secretion and its correlation with HLA and susceptibility to infections. **J. Clin. Immunol.**, 9(4):279-86, 1989.
- NUSSENZWEIG, R.S., VANDENBERG, J.P., MOST, J.P. & ORTON, C. Specificity of protective immunity procedures by X-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. **Nature**, 22: 488-489, 1969.

- O'GARRA, A & VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat. Rev. Immunol.**, 7(6):425-8, 2007.
- OGRA, P.L. & METECKY, H. Handbook of Mucosal Immunology. 1^a ed. Academic Press, San Diego. 766p, 1994.
- OKANLA, E.O., STUMPF, J.L. & DUSANIC, D.G. Resistance of mice immunized with irradiated and lyophilized stages of *Trypanosoma cruzi* to infections with metacyclics. **Int. J. Parasitol.**, 12: 251-256, 1982.
- OKAZAKI, K., Efeitos da radiação ionizante em células – Noções básicas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. CNEN/SP. São Paulo, 1995.
- OLSON, M.E., MORCK, D.W. & CERI, H. Preliminary data on the efficacy of a *Giardia* vaccine in puppies. **Can. Vet. J.**, 38(12): 777-779. 1997.
- OLSON, M.E., MORCK, D.W. & CERI, H. The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens. **Can. J. Vet. Res.**, 60: 249-256, 1996.
- OMATA, Y., TERADA, K., TAKA, A., ISAMIDA, T., KANDA, M. & SAITO, A. Positive evidence that anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody exists in the intestinal tract of infected cats and exerts protective activity against the infection. **Vet. Parasitol.**, 73(1-2): 1-11, 1997.
- ORJIH, A.U. & NUSSENZWEIG, R.S. Immunization against rodent malaria with cryopreserved irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29: 343-347, 1980.
- PASSOS, L.N., ARAÚJO-FILHO, O.F. & ANDRADE JUNIOR, H.F. Toxoplasma encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 42(3): 141-145, 2000.

- PAVIA, C.S. Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. **J. Immunol.**, 137: 2985-2990, 1986.
- PETERSEN, E., POLLAK, A. & REITER-OWONA, I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, 31(2): 115-144, 2001.
- PINCHUK, L.M., FILIPOV, N.M. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. **Immun. Ageing.**, 11: 1-12, 2008.
- PINCKNEY, R.D, LINDSAY, D.S. & BLAGBURN, B.L. Further characterization of the TS-4 temperature-sensitive mutant of *Toxoplasma gondii* in mice. **J. Parasitol.**, 81(1):118-121.
- PINHO, J.R.R., CARDI, B.A., ANDRADE Jr, H.F., BARR, P.J., BATHURST, I.C., VICENTE, E.J. & SCHENBERG, A.C. Immunogenic properties of the *M. leprae* recombination 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. **Int. J. Leprosy**, 63(3): 381-390, 1995.
- RAVDIN, J.I. Protozoal Diseases. In: Mandell, G.L. Benett, J.E. & Dolin, R. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol. 2, 4th Edition, Churchill Livingstone, p: 2393-2395, 1995.
- REMINGTON, J.S., McLEOD, R. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. & Klein, J.O (Ed.). Infectious Diseases of the fetus & newborn infant. 6th edition, W.B. Saunders Company, pp. 947-1091, 2005.
- RICHTER, D., HARN, D.A. & MATUSCHKA, F.R. The irradiated cercariae vaccine models: looking on the bright side of radiation. **Parasitol. Today**, 11: 288-293, 1995.

- ROBERTS, F. & McLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitol. Today**, 15(2): 51-57, 1999.
- ROBERTS, T., MURRELL, K.D. & MARKS, S. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitol. Today**, 10: 419-423, 1994.
- ROBERTS, T. & FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 196(2): 249-250, 1990.
- ROCHA, B. The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut. **Immunol. Rev.**, 215: 166-177, 2007.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **J. Amer. Med. Ass.**, 116: 801-807, 1941.
- SALATA, E., WIENDL., F.M. & CORRÊA, F.M.A. Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 15: 66-71, 1973.
- SANTO, A.H., PINHEIRO, C.E. & JORDANI, M.S. Aids as underlying and associated causes of death, State of S. Paulo, Brazil, 1998. **Rev. Saude Publica.**, 34(6): 581-588, 2000.
- SCHARTON-KERSTEN, T.M., YAP, G., MAGRAM, J. & SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.**, 185: 1261-1273, 1997.
- SCHELLER, L.F., STUMP, K.C. & AZAD, A.F. *Plasmodium berghei*: production and quantitation of hepatic stages derived from irradiated sporozoites in rats and mice. **J. Parasitol.**, 81: 58-62, 1995.

- SEAH, S.K. & HUCAL, G. The use of irradiated vaccine in immunization against experimental murine toxoplasmosis. **Can. J. Microbiol.**, 21(9): 1379-1385, 1975.
- SHEFFIELD, H.G. & MELTON, M.L. *Toxoplasma gondii*: transmission through feces in absence of *Toxocara cati* eggs. **Science**, 164: 431-432, 1969.
- SIBLEY, L.D. Recent origins among ancient parasites. **Vet. Parasitol.**, 115 (2): 185-198, 2003.
- SIBLEY, L.D., ADAMS, L.B., FUKUTOMI, Y. & KRAHENBUHL, J.L. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. **J. Immunol.**, 147: 2340-2345, 1991.
- SILVA, N.M., RODRIGUES, C.V., SANTORO, M.M., REIS, L.F., ALVARES-LEITE J.I. & GAZZINELLI, R.T. 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.**, 70: 859-868, 2002.
- SMITH, H. & NICHOLS, R.A. Zoonotic protozoa--food for thought. **Parassitologia.**, 48(1-2): 101-104, 2006.
- SOUZA, V.A., PANNUTI, C.S., SUMITA, L.M. & de ANDRADE Jr, H.F. Enzyme-linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles vaccines. **J. Med. Virol.**, 52(3): 275-279, 1997.
- SPLENDORE A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesion anatomiche de'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminaire. **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, 3: 109-112, 1908.

- SUARÉZ-ARANDA, F., GALISTEO JR., A.J., HIRAMOTO, R.M., CARDOSO, R.P.A., MEIRELES, L.R., MIGUEL, O. & ANDRADE JR., H.F. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Vet. Parasitol.**, 91(1-2): 23-32, 2000.
- SUBAUSTE, C.S. & WESSENDARP, M. CD40 restrains in vivo growth of *Toxoplasma gondii* independently of gamma interferon. **Infect. Immun.**, 74(3): 1573-1579, 2006.
- SUZUKI, Y., YANG, Q., REMINGTON, J.S. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, 81(6): 1032-1034, 1995.
- SZABO, S.J., SULLIVAN, B.M., PENG, S.L. & GLIMCHER, L.H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, 21: 713-758, 2003.
- SZUMIEL, I. Ionizing radiation-induced cell death. **Int. J. Radiat. Biol.**, 66(4): 329-341, 1994.
- TANA, WATARAI, S., ISOGAI, E. & OGUMA, K. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. **Lett. Appl. Microbiol.** 36(3): 135-139, 2003.
- TAYLOR, S.M., MALLON, T.R. & GREEN, W.P. Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm. **Vet. Rec.**, 119(15): 370-372, 1986.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, 24:145-149, 1992.

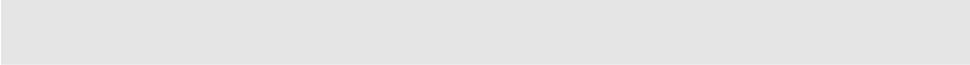
- TRINCHIERI, G. (2007). Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, 204(2): 239-243, 2007.
- VAN EGMOND, M., DAMEN, C.A., VAN SPRIEL, A.B. VIDARSSON, G. VAN GARDEREN, E. & VAN DE WINKEL, J.G. IgA and IgA Fc receptor. **Trends Immunol.**, 22(4): 205-211, 2001.
- VAN KNAPEN, F., KREMERS, A.F., FRANCHIMONT, J.H. & NARUCKA, U. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrated control of livestock production. **Vet. Q.**, 17(3): 87-91, 1995.
- VELGE-ROUSSEL, F., CHARDÈS, T., MÉVÉLEC, P., BRILLARD, M., HOEBEKE, J. & BOUT, D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 66(1): 31-38, 1994.
- VENKATESAN, P. & WAKELIN, D. Elisass for parasitologists: or lies, damned lies and Elisass. **Parasitol. Today.**, 9(6): 228-232, 1993.
- WALDELAND, H., PFEFFERKORN, E.R. & FRENKEL, J.K. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: pathogenicity and persistence in mice. **J. Parasitol.**, 69(1): 171-175, 1983.
- WALES, A. & KUSEL, J.R. Biochemistry of irradiated Parasite vaccines: suggested models for their mode of action. **Parasitol. Today.**, 8(11): 358-363, 1992.
- WEBSTER, J.P. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. **Schizophr. Bull.**, 33(3): 752-756, 2007.
- WEBSTER, J.P., BRUNTON, C.F.A. & MACDONALD, D.W. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, 109 (Pt 1): 37-43, 1994.

WEINER, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- beta-secreting regulatory cells. **Microbes. Infect.**, 3(11): 947-954, 2001.

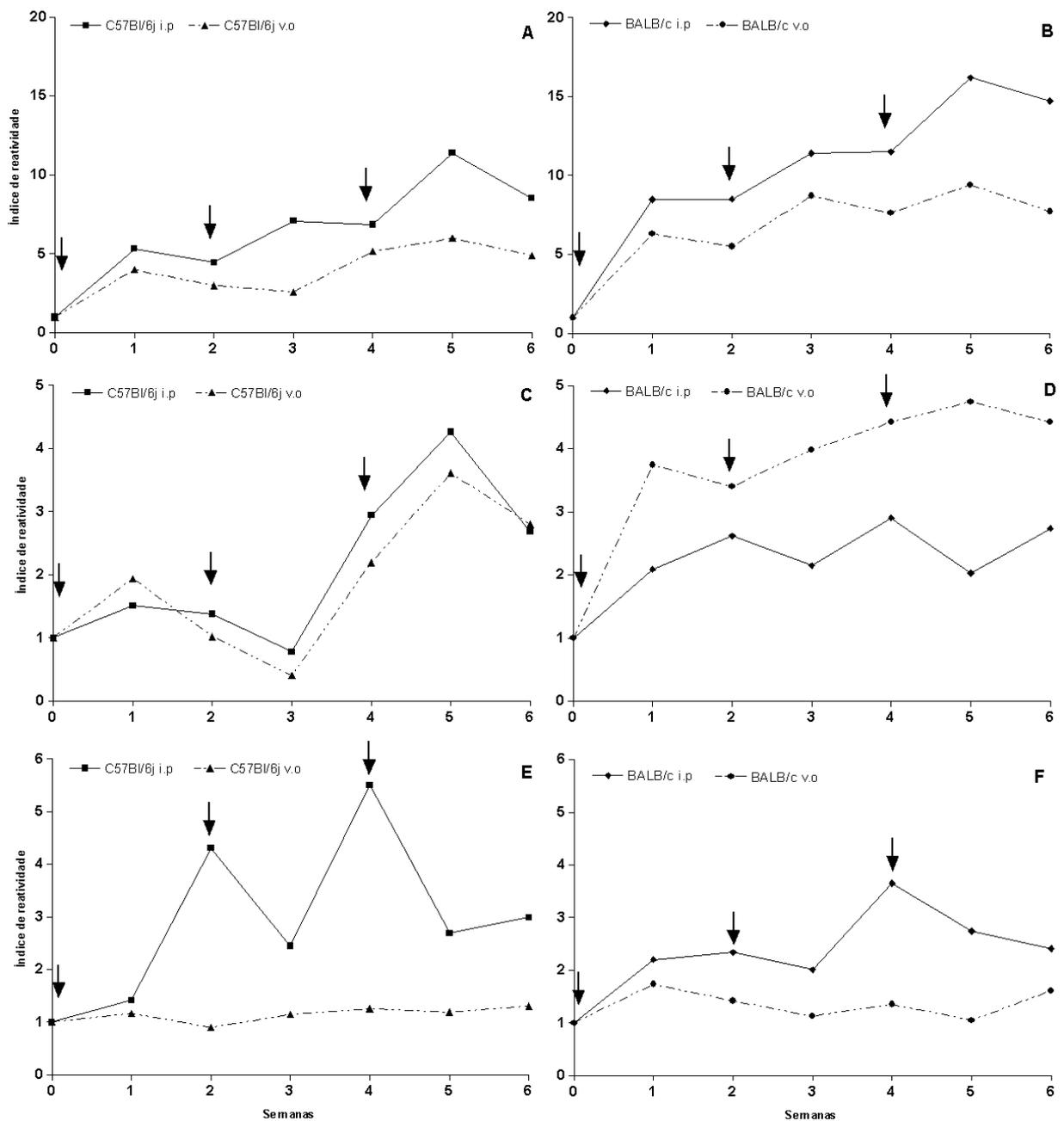
WEISS, L. M. & KIM K. In: *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods. pp. 800. Academic Press; 1^o ed. London, 2007.

WONG, S.Y & REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**. 7(3): 299-316, 1993.

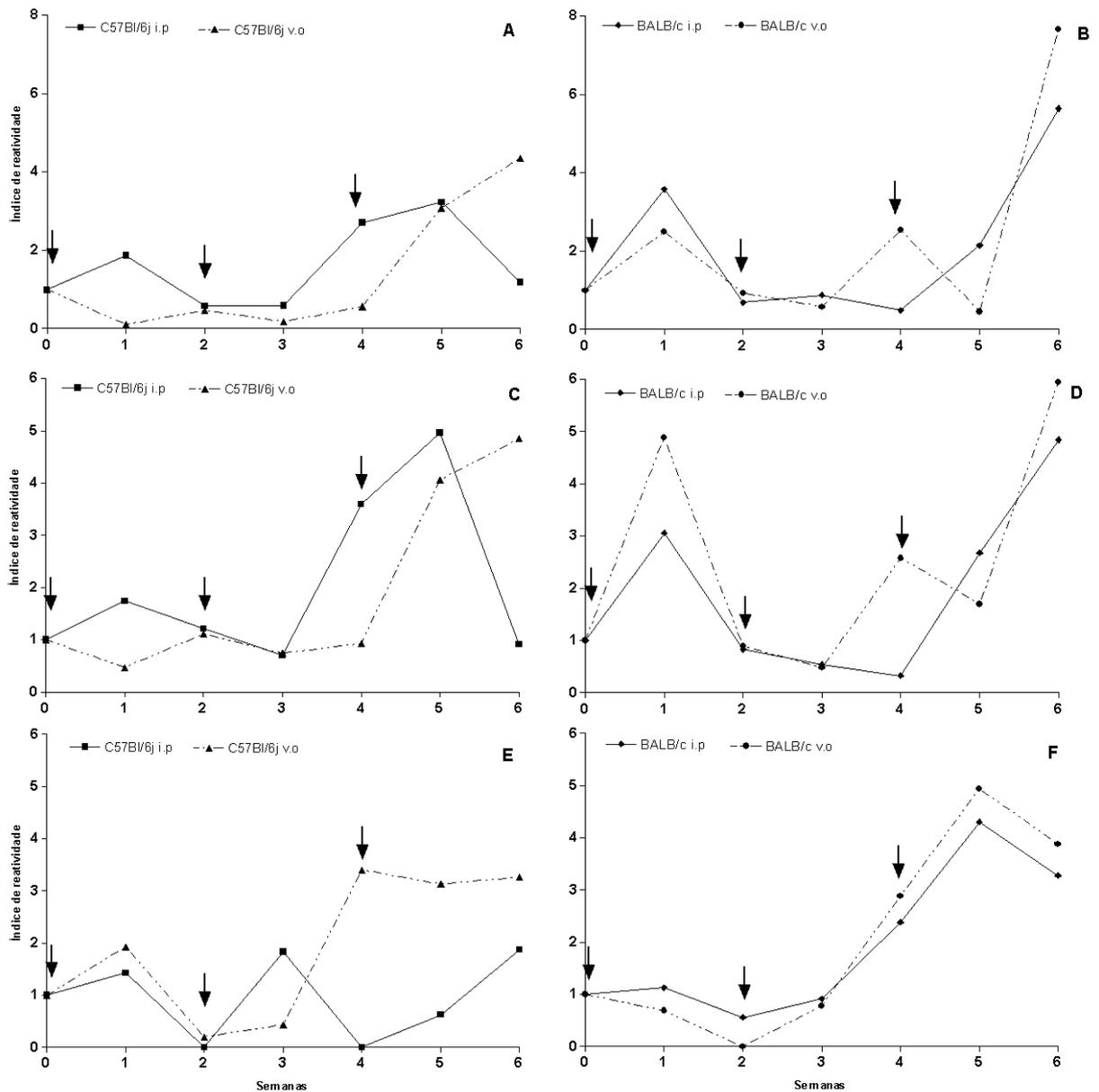
WOOF, J.M., MESTECKY, J. Mucosal immunoglobulins. **Immunol. Rev.**, 206: 64-82, 2005.



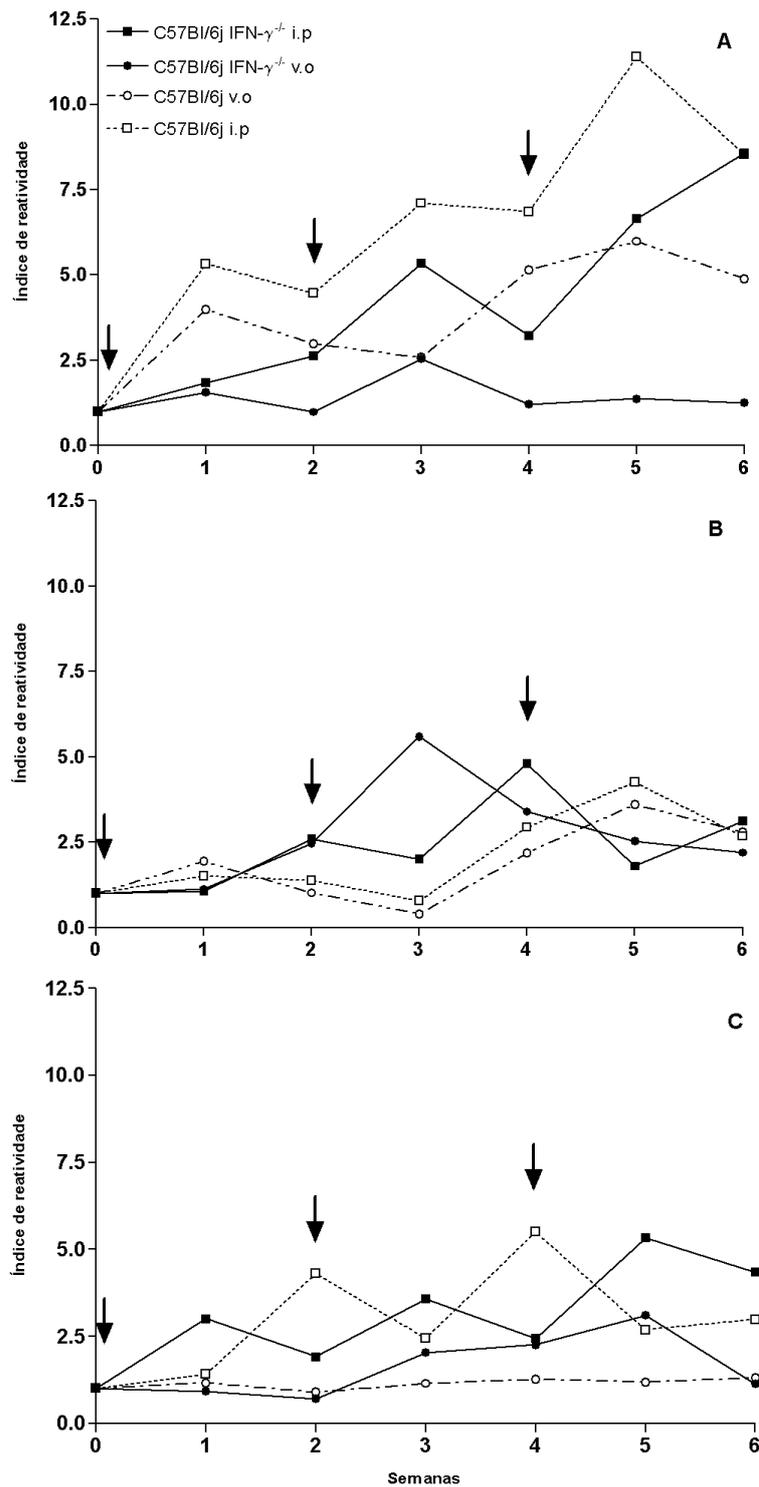
ANEXOS



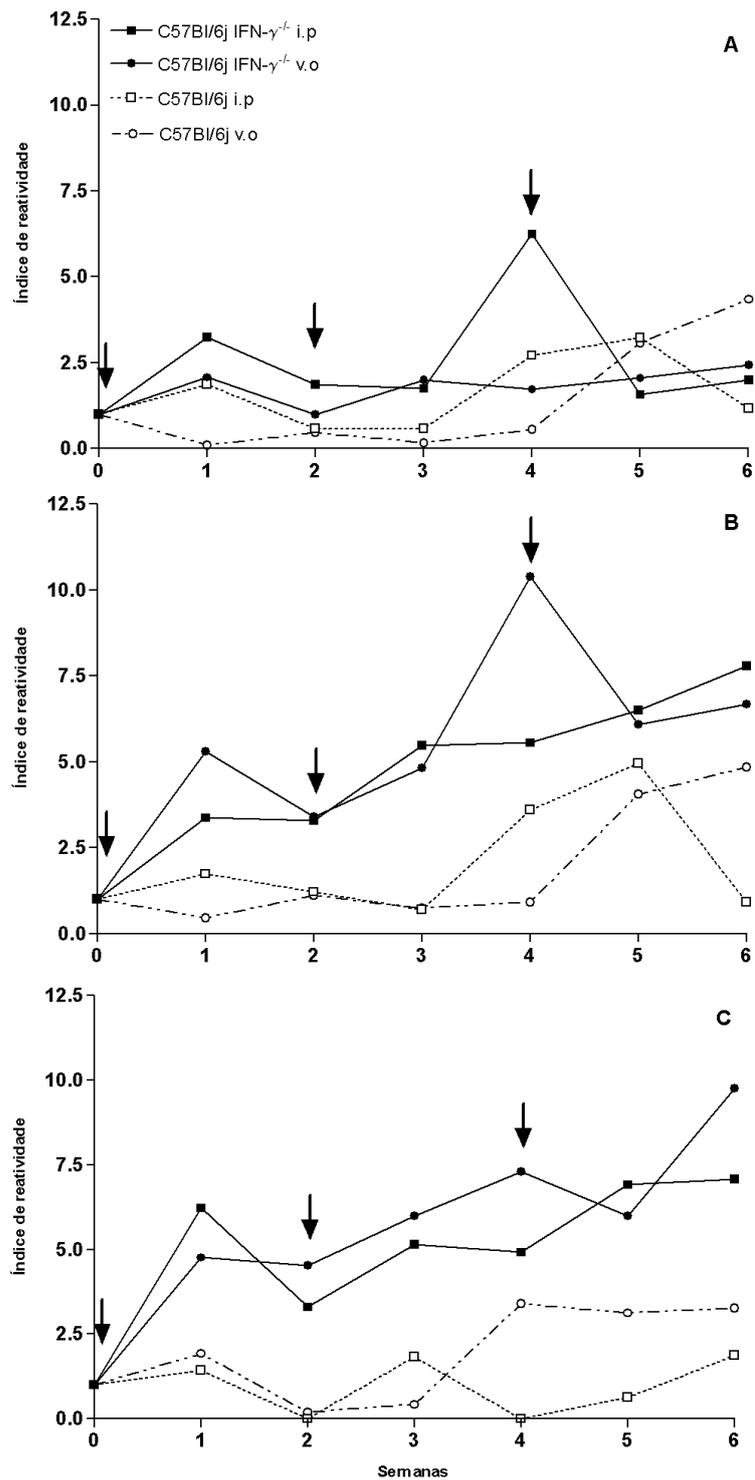
Anexo 1 – Produção de anticorpos IgG (A/B), IgA (C/D) e IgM (E/F), no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.



Anexo 2 – Excreção de anticorpos IgG (A/B), IgA (C/D) e IgM (E/F), nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizóitos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.



Anexo 3 – Produção de anticorpos IgG (A), IgA (B) e IgM (C) no soro de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.



Anexo 4 – Excreção de anticorpos IgG (A), S-IgA (B) e S-IgM (C) nas fezes de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizóitos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.

Anexo 5 – Variação da expressão gênica de citocinas esplênicas por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy, mensurado por Real-time PCR. Valores de Ct e respectivas análises de expressão pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Grupos	Ct IFN- γ		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	22.18	22.32	22.25	13.91	14.04	13.98	8.28	-7.70	139.64
C57Bl6/j (v.o)	29.21	28.66	28.94	17.35	16.55	16.95	11.99	-3.99	12.91
BALB/c (i.p)	21.80	22.01	21.91	13.65	13.62	13.64	8.27	-7.70	140.09
BALB/c (v.o)	22.35	22.90	22.63	14.24	13.91	14.08	8.55	-7.42	117.04
ME49	23.63	23.08	23.36	13.82	14.04	13.93	9.43	-6.55	66.75

Grupos	Ct IL-2		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	26.13	26.53	26.33	13.91	14.04	13.98	12.36	-1.33	2.39
C57Bl6/j (v.o)	28.88	28.75	28.82	17.35	16.55	16.95	11.87	-1.82	3.30
BALB/c (i.p)	26.41	26.34	26.38	13.65	13.62	13.64	12.74	-0.94	1.86
BALB/c (v.o)	27.18	26.83	27.01	14.24	13.91	14.08	12.93	-0.75	1.64
ME49	27.19	27.82	27.51	13.82	14.04	13.93	13.58	-0.10	1.07

Grupos	Ct IL-4		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	24.43	25.16	24.80	13.91	14.04	13.98	10.82	-2.42	4.97
C57Bl6/j (v.o)	27.75	30.15	28.95	17.35	16.55	16.95	12.00	-1.24	2.27
BALB/c (i.p)	21.41	21.52	21.47	13.65	13.62	13.64	7.83	-5.41	36.06
BALB/c (v.o)	25.98	26.12	26.05	14.24	13.91	14.08	11.98	-1.27	2.31
ME49	23.55	24.12	23.84	13.82	14.04	13.93	9.91	-3.34	9.12

Grupos	Ct IL-10		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	21.11	20.95	21.03	13.91	14.04	13.98	7.06	-4.18	15.23
C57Bl6/j (v.o)	27.57	27.59	27.58	17.35	16.55	16.95	10.63	-0.60	1.48
BALB/c (i.p)	19.45	19.71	19.58	13.65	13.62	13.64	5.95	-5.29	31.42
BALB/c (v.o)	23.95	24.06	24.01	14.24	13.91	14.08	9.93	-1.30	2.34
ME49	22.31	22.04	22.18	13.82	14.04	13.93	8.25	7.92	7.01

Anexo 6 – Variação da expressão gênica de citocinas intestinais por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy. Valores de Ct e respectivas análises de expressão pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Grupos	Ct IFN- γ		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	28.96	28.36	28.66	16.90	16.67	16.79	11.88	0.05	0.97
C57Bl6/j (v.o)	25.73	28.97	28.85	15.57	15.38	15.48	10.38	-1.45	2.53
BALB/c (i.p)	38.87	38.86	38.87	23.84	23.37	23.61	15.27	2.08	0.26
BALB/c (v.o)	28.22	28.24	28.23	15.91	15.90	15.91	12.33	-0.87	1.74
ME49	27.86	28.03	27.95	16.24	16.18	16.21	11.74	-0.09	1.06

Grupos	Ct IL-2		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	27.97	27.84	27.91	16.90	16.67	16.79	11.12	0.46	0.74
C57Bl6/j (v.o)	26.24	25.92	26.08	15.57	15.38	15.48	10.61	-0.06	1.04
BALB/c (i.p)	37.20	36.80	37.00	23.84	23.37	23.61	13.40	0.31	0.82
BALB/c (v.o)	27.48	28.08	27.78	15.91	15.90	15.91	11.88	-1.22	2.22
ME49	27.76	27.85	27.81	16.24	16.18	16.21	11.60	0.93	0.54

Grupos	Ct IL-4		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	30.45	29.79	30.12	16.9	16.67	16.79	13.34	-0.11	1.07
C57Bl6/j (v.o)	29.05	27.56	28.31	15.57	15.38	15.48	12.83	-0.61	1.50
BALB/c (i.p)	35.53	35.53	35.53	23.84	23.37	23.61	11.93	0.30	0.82
BALB/c (v.o)	28.6	30.52	29.56	15.91	15.9	15.91	13.66	2.03	0.26
ME49	30.13	30.77	30.45	16.24	16.18	16.21	14.24	0.80	0.59

Grupos	Ct IL-10		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl6/j (i.p)	27.04	26.65	26.85	16.9	16.67	16.79	10.06	0.85	0.57
C57Bl6/j (v.o)	25.19	25.38	25.29	15.57	15.38	15.48	9.81	0.60	0.68
BALB/c (i.p)	36.0	34.37	35.19	23.84	23.37	23.61	11.58	-0.82	1.71
BALB/c (v.o)	28.49	28.6	28.55	15.91	15.9	15.91	12.64	0.24	0.86
ME49	26.34	26.18	26.26	16.24	16.18	16.21	10.05	0.84	0.58

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)