



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ANA SUE SAMMI

**UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SOBRE A
ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM
GATOS DOMÉSTICOS**

Londrina
2016

ANA SUE SAMMI

**UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SOBRE A
ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM
GATOS DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S189u Sammi, Ana Sue.

Utilização de proteínas recombinantes sobre a eliminação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em gatos domésticos / Ana Sue Sammi. – Londrina, 2016.
42 f.: il.

Orientador: João Luis Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia veterinária. – Teses. 2. *Toxoplasma gondii*. – Teses. 3. Gato - Imunologia. – Teses. 4. Vacina veterinária. – Teses. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:577.27

ANA SUE SAMMI

**UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SOBRE A
ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM GATOS
DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Odilon Vidotto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Londrina, 11 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Otavio Isamu Sammi e Kiyomi Oba (*in memoriam*) pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão, André, por todas as conversas jogadas fora, amor e carinho eternos.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Luis Garcia, pelos ensinamentos e paciência durante todo esse caminho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Dauton Luiz Zulpo, por ter sido mais que um co-orientador, mas um amigo, me ajudando em tudo que precisei sem hesitar.

Aos Professores Doutores Odilon Vidotto e Katia Bresciani pela disposição e conhecimento indispensáveis na correção desse trabalho.

À todos os colegas de laboratório, pela ajuda sempre que necessário e pela amizade.

Aos residentes e técnicos dos laboratórios de parasitologia e zoonoses, pela disposição em ajudar em todos os momentos.

Aos estagiários por toda ajuda prestada. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Aos colegas de trabalho que se tornaram verdadeiros amigos Thaís Cabral, Thais Agostinho, Mércia, Ana Flávia, Sérgio, Beatriz, Priscilla, Vanessa, Alessandra, Nelson, João Pedro, Daniel e Felipe.

À toda equipe da UEL e do programa de pós graduação que ajudou direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

“Don’t panic!”

(Douglas Adams)

SAMMI, Ana Sue. **Avaliação do uso de proteínas recombinantes para diminuir a eliminação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em gatos domésticos**. 2016. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário que pertence ao filo Apicomplexa e pode parasitar quase todos os animais de sangue quente, incluindo o homem. A toxoplasmose pode causar sérias patologias fetais quando ocorre a infecção congênita. A doença também pode ser grave em pacientes imunocomprometidos. Os felídeos, incluindo o gato doméstico, são os únicos hospedeiros definitivos desse parasita, eliminando oocistos através das fezes e contaminando o meio ambiente. Por esse motivo os gatos domésticos são considerados a chave para o controle do *T. gondii*. Nesse contexto, uma vacina para essa espécie deveria evitar ou diminuir a eliminação de oocistos, conseqüentemente reduzindo a contaminação ambiental. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de proteínas recombinantes (rROP2 e rHSP70) como imunizante em gatos domésticos para diminuir a eliminação de oocistos de *Toxoplasma gondii*. Foram utilizados nove gatos, divididos em três grupos contendo 3 animais cada. G1: foi imunizado com 25 µg de rROP2 (*T. gondii*), 25 µg de rHSP70 (*E. tenella*) mais 20 µg de Quil-A; G2: recebeu 25 µg de *E. coli* mais 20 µg do Quil-A; G3: recebeu apenas solução salina, permanecendo como grupo controle. Todas as doses imunizantes foram administradas nos dias 0, 21 e 42 do experimento pela via nasal. O desafio foi feito no dia 72, com 600 cistos da cepa TgDoveBr8. As fezes de todos os animais foram examinadas por 21 dias após o desafio e o número de oocistos por grama de fezes foi determinado. O G1 eliminou 76,56% e 62,80% menos oocistos que os grupos G2 e G3, respectivamente. Também foi quantificado o número total de oocistos eliminados por cada grupo nos dias após o desafio. Nesse caso, os animais do G1 eliminaram 70,71% menos oocistos que os grupos G2 e 80,40% menos que o G3. Além disso, foi feito o teste de ELISA para avaliar os anticorpos IgG. Nenhum dos animais apresentou IgG antes do desafio, porém todos os gatos soroconverteram após serem desafiados. Não houve correlação entre a presença de IgG e a eliminação de oocistos. Com base nos resultados obtidos, observou-se que a imunização via nasal com proteínas recombinantes em gatos domésticos, utilizando o Quil-A como adjuvante, foi capaz de diminuir parcialmente a eliminação de oocistos de *T. gondii*.

Palavras-chave: Toxoplasmose. rROP2. rHSP70. Felídeos.

SAMMI, Ana Sue. **Utilization of recombinant proteins on *Toxoplasma gondii* oocysts elimination by domestic cats**. 2016. 42 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan of the Apicomplexa phylum that might parasitize almost every warm-blood animal, including humans. Toxoplasmosis may cause severe diseases on fetuses when the congenital infection occurs. The disease can be severe in immunocompromised patients. Felids, including the domestic cat, are the only definitive hosts of this parasite and they shed oocysts in their feces, contaminating the environment. For this reason, domestic cats are considered the key to control *T. gondii*. In this sense, a vaccine for this species should avoid or decrease the oocysts shedding and consequently reduce environmental contamination. The aim of this study was to evaluate the use of recombinant proteins (rROP2 and rHSP70) to immunize domestic cats to decrease the *T. gondii* oocyst shedding. Nine cats were divided into three groups, each one containing 3 animals. G1: was immunized with 25 µg of rROP2 (*T. gondii*), 25 µg of rHSP70 (*E. tenella*) plus 20 µg of Quil-A; G2: received 25 µg of *E. coli* plus 20 µg of Quil-A; G3: received only saline solution, remaining as a control group. All doses were administered on days 0, 21 and 42 of the experiment, by the nasal route. The challenge was performed on day 72, using 600 tissue cysts of TgDoveBr8 strain. Feces from all the animals were examined for 21 days after the challenge and the quantity of oocysts per gram of feces was determined. G1 shed 76.56% and 62.80% less oocysts than groups G2 and G3, respectively. The total amount of oocysts shed by each group on each day was also measured. In this case, G1 shed 70.71% less oocysts than G2 and 80.40% less than G3. Furthermore, ELISA was performed to evaluate IgG antibodies. None of the animals presented IgG before the challenge, however all cats seroconverted after being challenged. There was no correlation between the presence of IgG and oocysts shedding. Based on these results, we observed that The nasal immunization with recombinant proteins in domestic cats, using Quil-A as an adjuvant, was able to partially reduce oocysts shedding of *T. gondii*.

Keywords: Toxoplasmosis. rROP2. rHSP70. Felids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – *Toxoplasma gondii* oocysts per gram of feces shed by a group of cats immunized with rROP2 and rHSP70 (G1), adjuvant and vector control (G2) and saline control (G3).....32
- Figura 2** – Total of *Toxoplasma gondii* oocysts shed by a group of cats immunized with rROP2 and rHSP70 (G1), adjuvant and vector control (G2) and saline control (G3)32
- Figura 3** – Cats sera IgG antibody response against *T. gondii* evaluated by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** –Experimental design of cats immunized with rROP2 plus rHSP70 (G1), G2 was adjuvant control and G3 was saline control.....30
- Tabela 2** –*Toxoplasma gondii* oocysts shedding parameters in cats immunized with rROP2+rHSP70+Quil-A and controls. The animals were challenged afterward with the TgDoveBr8 strain.33

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 - <i>Toxoplasma gondii</i>: perspectivas de vacinas em gatos domésticos	10
1.1	Introdução	11
1.2	Gatos e a eliminação de oocistos	12
1.3	Resposta Imune	13
1.4	Vacinas em gatos domésticos	15
1.5	Considerações finais	16
1.6	REFERÊNCIAS	18
2	OBJETIVOS	24
3	CAPÍTULO 2 - Evaluation of <i>Toxoplasma gondii</i> oocysts shed by cats immunized with recombinant proteins (rROP2 and rHSP70)	25
	ABSTRACT	26
3.1	INTRODUCTION	27
3.2	MATERIALS AND METHODS	28
3.2.1	<i>Toxoplasma gondii</i> strains.....	28
3.2.2	Recombinant Proteins (rROP2) – Expression and purification	28
3.2.3	Recombinant Proteins (rHSP70) – Expression and purification.....	29
3.2.4	Immunization and challenge of cats.....	28
3.2.5	Ethics Comitee.....	29
3.2.6	Measurement of oocyst shedding	30
3.2.7	Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) – IgG.....	30
3.2.8	Statistics	31
3.3	RESULTS	31
3.4	DISCUSSION	34
3.5	CONCLUSION	36
3.6	REFERENCES	37
	CONCLUSÕES	42

1. Capítulo 1

Referencial Teórico

***Toxoplasma gondii*: perspectivas de vacinas em gatos domésticos**

1.1 - Introdução

Toxoplasma gondii foi descrito pela primeira vez em São Paulo, isolado de um coelho de laboratório, por Splendore (1908) e foi inicialmente classificado como *T. cuniculli*. Entretanto, no mesmo ano, Nicolle e Manceaux (1908) também isolaram o parasita de um roedor (*Ctenodactylus gundi*) no Instituto Pasteur de Túnis, na Tunísia, e posteriormente o classificaram como *T. gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909).

Este protozoário pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoazida, subclasse coccidiasina, ordem Eimeriorina, família Toxoplasmatidae, gênero e espécie *Toxoplasma gondii* (NICOLLE E MANCEAUX, 1909). É uma célula eucarionte composta por anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, microtúbulos, complexo de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático, microporo e um núcleo com parede bem definida (DUBEY, 1993; METSIS e PETERSEN, 1995).

T. gondii é considerado um dos parasitas melhor adaptados à seus hospedeiros, que incluem quase todos os animais endotérmicos, incluindo o homem (CARRUTHERS, 2002). Além disso, é encontrado em várias partes do mundo e foi descrito infectando cerca de um terço da população humana (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000)

A toxoplasmose geralmente se apresenta como uma infecção subclínica. Porém, a infecção durante a gestação pode causar sérias patologias fetais nos animais e nos humanos (DUBEY e BEATTIE, 1988). Na infecção congênita, o feto pode apresentar um quadro de hidrocefalia, coriorretinite e retardo mental (JONES et al., 2001). Já pacientes imunocomprometidos podem apresentar a encefalite toxoplásmica, considerada desde a década de 80 como a alteração neurológica mais importante em aids (LUFT e CHUA, 2000).

Os felídeos, incluindo o gato doméstico, são os únicos hospedeiros definitivos do parasita, ou seja, os únicos que eliminam oocistos nas fezes (FRENKEL et al., 1970). Estes são liberados não esporulados e após um período de um a cinco dias, dependendo das condições de temperatura e umidade, ocorre a esporulação (DUBEY et al., 1998). A infecção de homens e animais pode ocorrer através de três maneiras: (i) ingestão de oocistos esporulados em água e alimentos contaminados com fezes de gatos, (ii) pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos em carne crua ou mal cozida ou (iii) pela via transplacentária (BERNSTEIN et al., 1999; DUBEY, 2010).

Após a ingestão de cistos teciduais ou oocistos, os bradizoítos ou esporozoítos, respectivamente, são liberados e invadem o tecido intestinal, transformam-se em taquizoítos e multiplicam-se localmente, disseminando-se pela via hematogênica ou linfática. Após o desenvolvimento da imunidade pelo hospedeiro a última geração de taquizoítos dará origem aos bradizoítos, que podem permanecer em forma de cistos teciduais muitas vezes pela vida toda do hospedeiro (DUBEY et al., 2004). Esses cistos quando ingeridos por um animal carnívoro, liberam os

bradizoítos no intestino, causando uma nova infecção caracterizada inicialmente pela rápida multiplicação dos taquizoítos. Porém, quando os bradizoítos encistados são ingeridos por um felídeo, ocorre o ciclo sexuado no intestino desse animal, resultando na produção de oocistos (JACKSON et al., 1989).

O risco de contaminação por oocistos esporulados em populações humanas tem sido descrito (JONES et al., 2006; SANTOS et al., 2010). Um estudo demonstrou soropositividade para IgG e IgM para *T. gondii* em populações humanas residentes em Erechim, Rio Grande do Sul, onde havia um risco elevado (OR > 2,08) de infecção para os indivíduos que tiveram contato prévio com o solo (JONES et al., 2006). Além disso, um levantamento ambiental sugeriu que 22,58% (7/31) das amostras de solo obtidos a partir de jardins de escolas públicas no estado de São Paulo foram positivos para *T. gondii*, e concluiu-se que oocistos são amplamente distribuídos em áreas de escolas públicas localizadas na região (SANTOS et al., 2010). Adicionalmente, um surto de toxoplasmose humana foi descrito em Santa Isabel do Ivaí, Paraná, onde cerca de 426 pessoas foram infectadas, e a fonte de contaminação foi o acesso comum a água contaminada por oocistos esporulados de *T. gondii* (MOURA et al., 2006).

O consumo de carne crua ou mal cozida é considerada a mais importante fonte de transmissão de *T. gondii* para o ser humano, seguido de oocistos esporulados (COOK et al., 2000). Estudos demonstram que a carne suína infectada possui um risco considerável de infecção humana (CHOI et al., 1997; DUBEY et al., 1986; GAMBLE et al., 1997). No Brasil, Navarro et al. (1992) demonstraram que mais de 20% das amostras de carne suína estavam infectadas com cistos teciduais do parasita.

1.2 - Gatos e a eliminação de oocistos

A detecção de oocistos nas fezes de gatos é rara, sendo observada em apenas 1% dos animais estudados (DUBEY, 1995). Isso se deve ao fato de que os gatos eliminam oocistos por um curto período de tempo, entre uma e duas semanas (DUBEY, 2010). Por causa disso, dados de soroprevalência são importante, pois a maioria dos gatos soroconvertem após infecção experimental com cistos teciduais pela via oral e, realmente, após já terem eliminado oocistos (FRENKEL, 1972; DUBEY e THULLIEZ, 1989; DUBEY et al., 1995). Dessa forma, a soroprevalência pode indicar indiretamente uma contaminação ambiental (DUBEY, 1995). Existem inclusive descrições de filhotes lactentes (DUBEY; CARPENTER, 1993), bem como animais idosos (13 anos de idade) eliminando oocistos de *T. gondii* (SCHARES et al., 2008).

Um dos problemas no diagnóstico de oocistos nas fezes dos felinos é o baixo limiar de detecção nos exames de microscopia óptica, que gira em torno de 1000 oocistos por grama de fezes e amostras contendo uma quantidade menor de oocistos comprometem a sensibilidade do teste (DUBEY, 1995). Dessa maneira, o

uso do bioensaio em camundongos e de técnicas moleculares auxilia na detecção de baixas concentrações de oocistos nas fezes (DUBEY et al., 1995; FRENKEL et al., 1995).

Apesar de estudos demonstrarem experimentalmente a quantidade de oocistos que um gato pode eliminar, poucos estudos foram realizados a fim de quantificar os oocistos eliminados nas fezes de gatos naturalmente infectados (DUBEY, 2010). Dubey (1995) demonstrou que quatro de nove gatos reinfectedados pela via oral com cistos teciduais após 77 meses da primeira infecção com *T. gondii* re-eliminaram oocistos, porém em menor número. Ainda assim, dois dos quatro animais eliminaram uma grande quantidade. Entretanto, o potencial de re-eliminação de oocistos por gatos naturalmente infectados ainda é desconhecido (DUBEY e FRENKEL, 1974).

Dentre as formas de controle do parasita estão as práticas de manejo dos animais, educação sanitária e vacinação. O controle da toxoplasmose envolve a vacinação dos felídeos para impedir a eliminação de oocistos e consequente contaminação ambiental, dos animais de produção para diminuir o número de cistos teciduais nos tecidos, bem como, impedir a infecção transplacentária (DUBEY, 1996).

1.3 – Resposta Imune

A severidade da toxoplasmose pode ser relacionada à espécie acometida, idade do hospedeiro, hormônios sexuais, prenhez, estado imunológico, condição nutricional, estágio e cepa do parasita e presença de infecções concomitantes (LUFT e REMINGTON, 1992; DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1994; LIESENFELD et al., 2001; DUBEY e JONES 2008). Os mecanismos de defesa envolvidos na proteção do hospedeiro contra a infecção pelo *T. gondii* são a resposta imune humoral e celular (GARCIA, 2009). As diferenças na virulência entre as cepas do parasita são importantes na resistência do hospedeiro, sendo que as bases moleculares dessas diferenças permanecem pouco conhecidas. Três linhagens clonais do *T. gondii* foram descritas e relacionadas à virulência do parasita (HOWE e SIBLEY, 1995). A linhagem clonal tipo I está associada à virulência na fase aguda em camundongos, a tipo II é associada à indução da fase crônica e a tipo III é a menos virulenta (ALEXANDER e HUNTER, 1998).

Após a fase aguda da doença, o hospedeiro desenvolve uma boa imunidade, que geralmente é duradoura e protege contra reinfecções (DUBEY, 1994). Altos títulos de anticorpos específicos na presença de complemento, bem como citotoxicidade celular dependente de anticorpos, podem lisar os parasitas extracelulares e bloquear a invasão na célula do hospedeiro, uma vez que a produção máxima de anticorpos coincide com o desaparecimento de taquizoitos viáveis (FRENKEL, 1990; WASTUNG et al., 1995).

Acreditava-se que a imunidade contra o *T. gondii* dependesse da infecção crônica, através da persistência dos cistos teciduais que estimulariam constantemente o sistema imunológico do hospedeiro. Porém, estudos feitos com a cepa TS-4 (não cistogênica) demonstraram imunidade estéril, sem a presença de infecção crônica por cistos teciduais (FRENKEL, 1990).

Vários autores têm demonstrado a importância da resposta celular na imunidade contra o agente (FRENKEL, 1990; SHER e COFFMAN, 1992; BUXTON; 1993; IGARASHI et al., 2010; CUNHA et al., 2012; ZULPO et al., 2012), pois isoladamente a resposta humoral não é suficiente para promover a proteção do hospedeiro, por causa da localização intracelular do protozoário (GARCIA, 2009).

A imunidade para *T. gondii* é mediada principalmente pela imunidade celular (SUPPLY et al., 1999), no entanto, a imunidade humoral é importante na resistência da célula do hospedeiro, uma vez que esta pode inibir a proliferação intracelular do parasita (MINEO et al., 1994), bem como taquizoítos aderidos a anticorpos podem ser destruído por macrófagos “in vitro” (MINEO et al., 1993).

Os antígenos secretados-excretados (roptrias, grânulos densos e micronemas) do *T. gondii* têm uma função importante no estímulo da resposta imune, tanto na infecção aguda quanto na crônica. Antígenos que estimulam células CD4 específicas estão envolvidos na imunidade duradoura de indivíduos saudáveis cronicamente infectados (SAAVEDRA et al., 1991; SAAVEDRA et al., 1996).

Sendo a principal porta de entrada do *T. gondii* a via oral, a imunidade local via linfócitos e IgA é de fundamental importância na proteção contra o parasita (BOURGUIN et al., 1993; VELGE-ROUSSEL et al., 2000). A infecção pelo parasita induz a secreção de IgA no intestino, iniciando a função protetora do hospedeiro, e essa imunidade de mucosa tem sido relatada na proteção contra outros coccídeos intestinais pela inibição da penetração intestinal. Portanto, um estímulo eficiente da resposta imune de mucosa seria de grande valor no controle da infecção (CHARDÉS et al., 1990; CHARDÉS e BOUT, 1993).

O sistema imune de mucosa é uma importante linha de defesa contra microrganismos e parasitas. Infecção por *T. gondii* promovem um aumento de anticorpos específicos (IgA) contra parasitas intestinais. Além disso, o tecido epitelial intestinal produz algumas citocinas, como IL-2, IL-10, IL-5, TNF- α (Fator de Necrose Tumoral) e IFN- γ (interferon gama). IgA é responsável por formar uma barreira antigênica específica contra patógenos e toxinas intestinais, e não está relacionada com processos inflamatórios que causam dano à superfície epitelial (RUPOLO et al., 1998).

Considerando o exposto acima, vê-se que a imunidade para o *T. gondii*, desenvolvida por uma vacina, deve associar o local correto de imunização, bem como, o uso de antígenos do parasita que promovam proteção adequada, pois o parasita apresenta três estágios diferentes (esporozoíto, taquizoíto e bradizoíto) com diferenças antigênicas entre eles. Deve-se ter em mente também, que a relação parasita-hospedeiro pode ser bastante variável entre as espécies animais, e estudos desenvolvidos em uma determinada espécie pode não ser extrapolado para outra.

Assim, estudos com as principais espécies envolvidas no ciclo biológico do *T. gondii*, como os gatos domésticos, devem ser estimulados (SPEER et al., 1995; GARCIA, 2009).

Apesar do número de hospedeiros acometidos pelo *T. gondii* ser muito grande, têm-se demonstrado que algumas espécies (ratos e galinhas) possuem um alto grau de resistência natural. A idade também é um fator importante na resistência natural, pois animais jovens das mais variadas espécies apresentam-se mais susceptíveis à infecção (DUBEY e BEATTIE, 1988).

1.4 – Vacinas em gatos domésticos

Os gatos são considerados a chave para o controle do *T. gondii*, devido ao fato de esses animais serem os hospedeiros definitivos do parasita e eliminarem milhares de oocistos nas fezes, sendo responsáveis pela contaminação do meio ambiente. Nesse contexto, uma vacina para essa espécie deveria evitar ou diminuir a eliminação de oocistos (GARCIA et al., 2007). Nas últimas décadas houve um grande aumento no número de pesquisas e técnicas desenvolvidas para produção de novos imunógenos, porém ainda existem poucos estudos de vacinas controle da eliminação de oocistos (DUBEY, 1996; GARCIA, 2014).

A única vacina de uso comercial para toxoplasmose é a Toxovax® (MSD Animal Health, Summit, NJ, EUA), licenciada para uso em ovinos e caprinos apenas na Grã Bretanha, Nova Zelândia, França e Irlanda. Essa vacina utiliza taquizoítos vivos da cepa S-48, na dose de $\geq 10^5$ taquizoítos em 2mL, administrados via intramuscular nas fêmeas, pelo menos três semanas antes do acasalamento. A imunidade induzida pela vacina é de aproximadamente 18 meses caso não ocorra desafio natural. Após a vacinação pode-se observar o aumento da temperatura corporal dos animais e a carne não deve ser consumida por pelo menos 42 dias após a imunização. O potencial da Toxovax® na prevenção da formação de cistos teciduais em ovelhas e cabras é desconhecido (BUXTON et al., 1993).

Para o desenvolvimento da imunidade por meio de uma vacina deve-se associar o local correto de imunização com o uso de proteínas do parasita que promovam proteção adequada, considerando que o parasita apresenta três estágios diferentes (esporozoíto, taquizoíto e bradizoíto) e com diferenças antigênicas entre eles (SPEER et al., 1995; GARCIA et al., 2004).

A via nasal foi descrita como uma rota capaz de estimular a imunidade celular e sistêmica, além de requerer menor quantidade de antígeno para promover a imunidade em comparação com a via oral, pois a atividade proteolítica na via nasal é muito menor que na via oral (VELGE-ROUSSEL et al., 2000). Considerando que a porta de entrada natural do *T. gondii* é a superfície de mucosa intestinal e que uma infecção adquirida naturalmente gera uma imunidade protetora persistente, vê-se a importância do desenvolvimento de uma vacina que estimule a proteção de mucosa (BONEFANT et al., 2001).

Frenkel et al. (1991) verificaram uma proteção de 100% utilizando uma vacina viva, contendo bradizoítos de uma cepa mutante de *T. gondii*, chamada T-263 (não produz oocistos em gatos). Durante as inoculações com essa cepa, não houve eliminação de oocistos, e quando os gatos foram desafiados com uma cepa normal, os autores observaram que nenhum dos gatos eliminou oocistos. Freyre et al. (1993) utilizaram cistos teciduais intactos e bradizoítos livres da cepa T-263 como imunizante e observaram uma imunidade de 100% quando houve o desafio com uma cepa heteróloga.

Outro estudo feito para determinar a eficácia da cepa T-263 como imunógeno em felinos foi realizado a campo, tendo reduzido a exposição de suínos ao *T. gondii* (MATEUS-PINILLA et al., 1999). Um problema dessa vacina é a utilização da cepa viva, o que pode apresentar problemas de infecção em outras espécies (DUBEY, 1995).

Omata et al. (1996) testaram uma vacina em gatos utilizando taquizoítos irradiados com ^{60}Co da cepa Berveley, o que impediu parcialmente a eliminação de oocistos, já que 43% dos animais não eliminaram oocistos quando desafiados com cistos cerebrais da mesma cepa. Nesse mesmo estudo, outro grupo foi vacinado com taquizoítos irradiados da cepa RH e, quando desafiados com a cepa Berveley, todos eliminaram oocistos.

Alternativamente, uma vacina de DNA expressando a proteína ROP2 do parasita foi testada em felinos. A imunização induziu a produção de IgG sérica e reduziu a quantidade de cistos formados no cérebro dos gatos, porém não apresentou eficácia quanto à diminuição de oocistos nas fezes (MISHIMA et al., 2002).

Garcia et al. (2007) testaram uma vacina de roptrias mais adjuvante Quil-A em felinos através da via nasal, com o objetivo de diminuir a eliminação de oocistos. O estudo obteve como resultado uma diminuição de 89% de oocistos eliminados pelo grupo imunizado em relação ao grupo controle. Utilizando a mesma vacina, Zulpo et al. (2012) obtiveram uma redução 98% na eliminação de oocistos, quando testada em um grupo com maior número de animais (n=5), em comparação ao grupo controle.

1.5 – Considerações finais

Como os felinos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii*, reduzir a eliminação de oocistos por esses animais através da vacinação pode diminuir a contaminação ambiental e, conseqüentemente, a transmissão da toxoplasmose para os humanos e outros animais.

Por isso é necessário que mais estudos de vacinas em gatos domésticos sejam realizados. É importante que uma vacina para essa espécie associe o local correto de imunização com antígenos que estejam presentes em todas as fases

infectantes do parasita para que haja uma boa resposta imune do hospedeiro. Para isso, a vacina ideal deve estimular tanto a resposta imune humoral quanto a celular.

1.6 – Referências

ALEXANDER, J.; HUNTER, C.A. Immunoregulation during toxoplasmosis. **Immunology of Intracellular Parasitism** 70, 81-102, 1998.

BERNSTEIN, L; GREGORY, C.R.; ARONSON, L.R.; LIRTZMAN, B.A.; BRUMMER, D.G. Acute toxoplasmosis following renal transplantation in three cats and a dog. **Journal of the America Veterinary Medical Association** 215, 1123, 1999.

BONENFANT, C.; DIMIER-POISSON, I.; VELGE-ROUSSEL, F.; BUZONI-GATEL, D.; RAPPUOLI, R.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity** 69, 1605-1612, 2001.

BOURGUIN, I.; CHARDES, T.; BOUT, D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhances protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. **Infection and Immunity** 61, 2082-2088, 1993.

BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitology Today** 9, 335-337, 1993.

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

CHARDÉS, T.; BOUT, D. Mucosal immune response in toxoplasmosis. **Research in Immunology** 144, 57-60, 1993.

CHARDÉS, T.; BOURGUIN, I.; MEVELEC, M.N.; DUBREMETZ, J.F.; BOUT, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigen. **Infection and Immunity** 1240-1246, 1990.

CHOI, W.Y.; NAM, H.W.; KWAK, N.H.; HUH, W.; KIM, Y.R.; KANG, M.W.; CHO S-Y; DUBEY J.P. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases** 75, 1280-1282, 1997.

COOK, A.J.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PERTESSEN, E.; JENUN, P.A. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **British Medical Journal** 321, 142-147, 2000.

CUNHA, I.A.L.; ZULPO, D.L.; BOGADO, A.L.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; IGARASHI, M.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Qui-A. **Veterinary Parasitology** 186, 216-221,2012.

DUBEY, J.P.; MURRELL, K.D.; FAYER, R.; SCHAD, G.A. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. **Journal of America Veterinary Medical Association** 188, 1035-1037, 1986.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: **KREIER, J.P. Parasitic Protozoa**, 1993.

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

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

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology** 64, 65–70, 1996.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of animals and humans. **Boca Raton: CRC Press**, 2010.

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

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

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasma* of animals and man. **Boca Raton: CRC Press**, 1988.

DUBEY, J.P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 194, 1297-1299, 1989.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L. Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 203, 1546-1549, 1993.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology** 38, 1257-1258, 2008.

DUBEY, J.P.; BAKER, D.G.; DAVIS, S.W.; URBAN, J.F.; SHEN, S.K. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non-persistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research** 55, 982-987, 1994.

DUBEY, J.P.; WEIGEL, R.M.; SIEGEL, A.M.; THULLIEZ, P.; KITRON, U.D.; MITCHELL, M.A.; MANNELLI, A.; MATEUS-PINILLA, N.E.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; TODD, K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology** 81, 723-729, 1995.

DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology** 84, 749-752, 1998.

FRENKEL, J.K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 196, 233-240, 1990.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidia oocysts. **Science** 167, 893-896, 1970.

FRENKEL, J.K.; PFEFFERKORN, E.R.; SMITH, D.D.; FISHBACK, J.L. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal Veterinary Research** 52, 759-763, 1991.

FRENKEL, J.K.; HASSANEIN, K.M.; HASSANEIN, R.S.; BROWN, E.; THULLIEZ, P.; QUINTERO-NUNEZ, R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 53, 458-468. 1995.

FREYRE, A.; CHOROMANSKI, L.; FISHBACK, J.L.; POPIEL, I. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology** 79, 716-719, 1993.

GAMBLE, H.R. Parasites associated with pork and pork products. Review **Science Technology (International Office of Epizootics)** 16, 2, 496-506. 1997.

GARCIA, J. L. Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. **Expert Reviews Vaccines** 6, 215-225, 2009.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T.; MACHADO, R. Z.; SINHORINI, I. L. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. **Experimental Parasitology** 108, 40-46, 2004.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; BIAZZONO, L.; FREIRE, R.L.; GUIMARÃES, J.S.J.; CRYSSAFIDIS, A.L.; BUGNI, F.M.; CUNHA, I.A.L.; HAMADA, F.N.; DIAS, R.C.F. Protective activity against shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by intranasal route. **Veterinary Parasitology** 145, 197-206, 2007.

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

IGARASHI, M.; KANO, F. S.; 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 cysts formation in BALB/c mice. **Experimental Parasitology** 118, 386-392, 2008.

IGARASHI, M.; ZULPO, D.L.; CUNHA, I.A.L.; BARROS, L.D.; PEREIRA, V.F.; TARODA, A.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C.; JENKINS, M.C.; GARCIA, J.L. *Toxoplasma gondii*: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 19, 246-251, 2010.

JACKSON, M.H.; HUTCHISON, W.M.; BAKER, J.R.; MULLER, R. Advances in parasitology. **Academic Press, London** 55-86, 1989.

JONES, J.L.; KRUSZON-MORAN, D.; WILSON, M.; MCQUILLAN, G.; NAVIN, T.; MCAULEY, J.B. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors. **American Journal of Epidemiology** 154, 357-365, 2001.

JONES, J.L.; MUCCIOLI, C.; BELFORT-JR, R.; HOLLAND, G.N.; ROBERTS, J.M.; SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases** 12, 582-587, 2006.

KALINNA, B.H. DNA vaccines for parasitic infections. **Immunology and Cell Biology** 75, 370-375, 1997.

LIESENFELD, O.; NGUYEN, T.A.; PHARKE, C.; SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection of with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology** 87, 1491-1493, 2001.

LUFT, B.J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases** 15, 211-222, 1992.

LUFT, B.J.; CHUA, A. Central nervous system toxoplasmosis in HIV: pathogenesis, diagnosis, and therapy. **Current Infectious Diseases** 2, 358-362, 2000.

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. **Journal of Parasitology** 85, 855-860, 1999.

METSIS, A.; PETTSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acidphosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology** 81, 472-479, 1995.

MINEO J.R.; MCLEOD R.; SMITH J.; KHAN I.A.; ELY K.H.; KASPER L.H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **Journal of Immunology** 150, 3951-3964, 1993.

MINEO J.R.; KHAN I.A.; KASPER L.H. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. **Experimental Parasitology** 79, 351-361, 1994.

MISHIMA, M.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T. Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats. **Parasitology Research** 88, 144-149, 2002.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M., WADA, M.Y., JONES, J.L., TUBOI, S.H., CARMO, E.H., RAMALHO, W.M., CAMARGO, N.J., TREVISAN, R., GRAÇA, R.M., SILVA, A.J.; MOURA, I., DUBEY, J.P., GARRETT, D.O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases** 12, 326–329, 2006.

NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii*: Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias** 13, 15-18, 1992.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishmania du gondi. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris** 147, 736-766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris** 148, 369-372, 1909.

OMATA, Y.; AIHARA, Y.; KANDA, M.; SAITO, A.; IGARASHI, I.; SUZUKI, N. *Toxoplasma gondii*: experimental infection in cats vaccinated with ⁶⁰Co-irradiated tachyzoites. **Veterinary Parasitology** 65, 173–183, 1996.

RUPOLO, B.S.; MIRA, J.G; KANTOR, J.R.O. IgA deficiency. **Jornal de Pediatria** 74, 433-440, 1998.

SAAVEDRA, R.; DE MEUTER, F.; DECOURT, J.L.; HERION, P. Human T-cell clone identifies a potentially protection 54-KDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in Escherichia coli. **Journal of Immunology** 147, 1975-1982, 1991.

SAAVEDRA, R.; BECERILL, M.A.; DUBEAUX, C.; LIPPENS, R.; DE VOS, M.J.; HÉRION, P.; BOLLEN, A. Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP 2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity** 64, 3858-3862, 1996.

SANTOS, T.R., NUNES, C.M., LUVIZOTTO, M.C.R., MOURA, A.B., LOPES, W.D.Z., COSTA, A.J., BRESCIANI, K.D.S. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. **Veterinary Parasitology** 171, 53-57, 2010.

SCHARES, G.; VRHOVEC, M.G.; PANTCHEV, N.; HERRMANN, D.C.; CONRATHS, F.J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and Hammondia hammondi oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. **Veterinary Parasitology** 152: 34-45, 2008.

SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Veterinary Immunology** 10, 385-409, 1992.

SPEER, C.; TILLEY, M; TEMPLE, M.E.; BLIXT, J.A.; DUBEY, J.P.; WHITE, M.W. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. **Molecular and Biochemical Parasitology** 75, 75-86, 1995.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli: incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uomo. **Revista da Sociedade Científica de São Paulo** 3, 109-112, 1908.

SUPPLY, P.; SUTTON, P.; COUGHLAN, S. N.; BILO, K.; SAMAN, E.; TREES, J.; CESBRAUN-DELAUW, M. F.; LOCHT, C. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, 17, 705-714, 1999.

TENTER, A M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology** 30, 1217-1258, 2000.

VELGE-ROUSSEL, F.; MARCELO, P.; LEPAGE, A.C.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D.T. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infeccion and Immunity** 68, 969-972, 2000.

WASTUNG, J.M.; HARKINS, D.; MALEY, S.; INNES, E.; PANTON, W.; THOMSON, K.; BUXTON, D. Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal Compendium Pathology** 112, 53-62, 1995.

ZULPO, D.L.; HEADLEY, S.A.; BIAZZONO, L.; CUNHA, I.A.L.; IGARASHI, M.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; CARDIN, S.T.; BOGADO, A.L.G.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology** 131, 223-230, 2012.

2. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o uso de proteínas recombinantes para diminuir a eliminação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em gatos domésticos.

ESPECÍFICOS

Expressar os genes *rop2* (*T. gondii*) e *hsp70* (*E. tenella*) em vetor de expressão para obtenção de proteínas recombinantes.

Avaliar a cinética da eliminação de oocistos do *T. gondii* em gatos domésticos imunizados pela via nasal com proteínas recombinantes (rROP2 e rHSP70).

Avaliar a resposta imune humoral dos animais imunizados e infectados com *T. gondii*.

3. CAPÍTULO 2

Evaluation of *Toxoplasma gondii* oocysts shed by cats immunized with recombinant proteins (rROP2 and rHSP70)

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite that can infect warm-blooded animals, including birds and humans. The domestic cat is the main definitive host and it can shed millions of oocysts by feces, contaminating the environment. The aim of the present study was to evaluate oocysts shedding in cats immunized with rROP2 and rHSP70 of *T. gondii* and *E. tenella*, respectively. Nine cats were divided into three groups: G1, G2 and G3 (n=3). Animals from G1 received 25 µg of each recombinant protein plus Quil-A. G2 received *E. coli*, as a vector control, plus Quil-A. And G3 received saline solution (control group). All treatments were performed on days 0, 21 and 42 by intranasal route. Challenge was executed in all groups on day 72 with 600 tissue cysts of *T. gondii* (TgDoveBr8 strain). All animals had their feces examined and the number of oocysts was determined for 21 days after the challenge. Animals from G1 shed less oocysts and showed a higher preventable fraction than G2 (PF=62.8%) and G3 (PF=76.56%). ELISA was performed to detect anti-*T. gondii* IgG, but there was no correlation between oocysts shedding and antibody levels. The results of this study suggest that recombinant proteins plus Quil-A were able to partially reduce oocysts shedding in domestic cats immunized by the nasal route.

Key words: toxoplasmosis, vaccine, definitive host.

3.1 - INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite able to infect all warm blood animal, including the human being. Felids are the definitive hosts of this parasite and domestic cats are important because of the strict contact that they have with humans (Frenkel et al., 1970; Dubey and Beattie, 1988).

The domestic cat is a very popular pet in many countries and the number of cats has increased quickly, so great importance is given to the zoonotic potential of domestic felines, chiefly focusing on the transmission of *T. gondii* to humans, since after the primary infection, the cat might shed millions of oocysts in its feces and consequently contaminate the environment, what can be a transmission source for animals and humans (Dubey and Beattie, 1988; Innes et al., 2009; Dabritz and Conrad, 2010).

However, there are very few studies on vaccines against oocysts shedding in cats. Some studies used a live mutant strain (FRENKEL et al., 1991), irradiated tachyzoites (Omata et al., 1996) or roptries of the parasite (Garcia et al., 2007; Zulpo et al., 2012). All of those studies observed a partial protection on oocysts shedding.

ROP2 is a protein member of the roptries family and is expressed by tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites (Saavedra et al., 1996). It has been proposed as a vaccine candidate against toxoplasmosis because it is deeply associated with the parasitophorous vacuole membrane and also due to the proteins interaction when adhering to the host cell (Boothroyd and Dubremetz, 2008; Sadak et al., 1988). The use of rROP2 antigen has revealed protective activity against chronic infection. Igarashi et al. (2008) showed that ROP2 vaccination resulted in a decreased in tissue cysts burden. Therefore, rROP2 could be a good starting point to develop an effective vaccine against toxoplasmosis infection.

Heat Shock Proteins (HSPs) are important immunologic targets in response to pathogens and have been shown to be highly conserved among a large variety of species and although their functions are not completely understood, it's known that these proteins are essential for the survival of the cell (Bensaude et al., 1983; Newport et al, 1988; Schlesinger, M. J., 1990). Vaccines using HSPs target multiple innate and antigen-driven pathways, being attractive for treatment of intracellular and extracellular pathogens (Ferraz et al., 2004).

Several studies have shown the ability of protozoan HSP70 to increase the immunogenicity of associated antigens such as HSP70 from *Trypanosoma cruzi* (Planelles et al., 2001), *Plasmodium falciparum* (Rahman et al., 2003; Qazi et al., 2005) and *T. gondii* (Makino et al., 2011) can function as adjuvants and can greatly enhance the protective immunity induced by antigens against protozoan infection. HSP70 was chosen among the HSPs, because it may have an important role in *T. gondii* stage conversion from bradyzoites to tachyzoites (Silva et al., 1998).

The Quil-A adjuvant is a saponin, important in the immune response of the vaccine in animals. It is widely used in animals due to its low cost, simple design and

safety (Cox and Coulter, 1997; Garcia et al., 2005; Igarashi et al, 2008; Cunha et al, 2012;. Zulpo et al, 2012).

The aim of the present study was to evaluate oocysts shedding in cats immunized with recombinant proteins rROP2 (*T. gondii*) and rHSP70 (*E. tenella*).

3.2 - MATERIALS AND METHODS

3.2.1 - *Toxoplasma gondii* strains

Two strains of *T. gondii* were used in this experiment: RH (type I) and TgDoveBr8 (type II), respectively isolated by Sabin (1941) and Barros et al. (2014). The RH strain was used for production of recombinant proteins and antigen for the ELISA. The TgDoveBr8 strain was used for the production of tissue cysts to challenge the cats. *T. gondii* tissue cysts of the TgDoveBr8 strain was performed as previously described (Zulpo et al., 2012). Ten mice were infected with 50 sporulated oocysts of *T. gondii* by the oral route. These animals were euthanatized 60 days after being infected, and the burden of brain cysts were counted and prepared for challenge (approximated 600 cysts to each cat in a total of 2 mL of saline).

3.2.2 - Recombinant Proteins (rROP2) – Expression and purification

The recombinant proteins (rROP2) of *T. gondii* was obtained as previously described (Igarashi et al., 2010).

E. coli Rosetta (DE3) transformed with pTrcHis/ROP2 were grown with vigorous shaking at 37 °C, in 50 ml LB supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 100 µg/ml chloramphenicol to an optical density at 600 nm of 0.8. Protein production was then induced with isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at the final concentration of 1mM. The culture was incubated with shaking at 37 °C for 4 h. The cells were harvested by centrifugation and the pellets were resuspended and lysed in 20mM sodium phosphate and 500mM sodium chloride pH 7.8 followed by 3 freezing-defreezing cycles for the soluble phase.

The soluble fraction was applied directly onto Ni-NTA Superflow resin (Qiagen, QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) preequilibrated with 20mM sodium phosphate, 500mM sodium chloride, pH 7.8 for soluble samples. The recombinant soluble antigen was eluted from resin by gravity flow with native elution buffer (200mM monobasic sodium phosphate and 5M NaCl pH 4.0), after 30 min incubation in elution buffer and gentle agitation at room temperature. The protein concentration was determined using Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific®, San Jose, CA, USA).

3.2.3 – Recombinant Proteins (rHSP70) – Expression and purification

The recombinant rHSP70 was obtained from *Eimeria tenella* as described by Bogado (2013).

The rHSP70 was expressed on *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cells were grown in LB with 100 µg/ml ampicillin, at 37°C to an optical density (DO₆₀₀) of 0,5-0,7. The expression of the protein was induced with isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at the final concentration of 1mM, at 37°C for 4 hours.

The purification was realized in denaturing conditions with guanidine in Ni-NTA Superflow resin (Qiagen, QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda., São Paulo, Brazil). The recombinant antigen was eluted from the resin by gravity flow with urea 8M.

3.2.4 – Immunization and challenge of cats

Nine domestic short hair cats, of both sexes, between 6 and 9 months of age, were randomly allocated in individual cages. The animals were monitored for *T. gondii* and other diseases for two months prior to the beginning of the experiment. All cats were serum negatives (titer <16) for *T. gondii* by the indirect immunofluorescence assay (Camargo, 1974), before being immunized. The absence of *T. gondii* oocysts was confirmed by fecal examination (Dubey, 1995). The cats were divided into three groups, each group containing three animals (Table 1). G1 animals received 25 µg of rROP2 plus 25 µg of rHSP70 and Quil-A (20 µg); G2 received 25 µg of *E. coli* and Quil-A (20 µg); G3 received only saline solution. The animals were immunized nasally (140 µl of final solution was administrated in each animal per nostril). Intranasal vaccination was achieved by the introduction of an adapted stomach tube half-way through the nostrils of each cat. All inoculations were performed on days 0, 21 and 42 of the experiment. G1, G2 and G3 animals were challenged on day 72 with 600 cysts of the TgDoveBr8 strain (contained in a volume of 2 mL) administered via stomach tube. The animals were anesthetized with tiletamine plus zolazepam (Zoletil®, Virbac – Brazil, 3.15 mg/kg/IM) to the challenge.

3.2.5 – Ethics Committee

This study was approved by the Institutional Ethics Committee in Animal Use (CEUA, protocol number 102/12).

Table 1: Experimental design of cats immunized with rROP2 plus rHSP70 (G1), G2 was adjuvant control and G3 was saline control.

Experimental groups	Immunization route	Immunization protocols (0, 21, 42 days) ¹	Challenge (Day 72)
G1	Intranasal	25 µg rROP2 + 25 µg rHSP70 + QuilA (20 µg)	600 cysts TgDoveBr8
G2	Intranasal	25 µg <i>E. coli</i> + QuilA (20 µg)	600 cysts TgDoveBr8
G3	Intranasal	Saline Solution	600 cysts TgDoveBr8

¹ Period during which procedure was performed.

3.2.6 – Measurement of oocyst shedding

Feces from each cat were collected from the 1st until the 20th day after challenge and were examined microscopically for oocysts as described previously (Garcia et al., 2007; Zulpo et al., 2012). Briefly, 2 g of feces obtained over a period of 24 hours were admixed with 10 mL of sucrose solution (specific gravity, 1.18), filtered, and centrifuged (1200xg for 10 min). One drop of solution, removed from the meniscus, was examined microscopically. When oocysts were detected the supernatant was collected (approximated 9 mL) admixed with 40 mL of water in a 50 mL tube, and centrifuged (1200xg) for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment elevated to 1 mL with water. The number of oocysts was then determined in four WBC chambers of a hemocytometer. The preventable fraction was calculated [(reference value – vaccinated group)/reference value] and multiplied by 100 to obtain the percentage.

3.2.7 - Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) - IgG

Blood and serum samples were obtained on days 0, 21, 42, 72, 79, 86, 93, 107, 137 and 167 of the experiment to evaluate serum. The ELISA assay was performed as described previously (Garcia et al., 2007). Optimal dilutions were established by using checkerboard titrations with dilutions of sera and conjugates. Total antigen of *T. gondii* were used to coat the flat-bottom 96-well polystyrene microtitration plates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Denmark) with 0.1 mL of the antigens (5 µg/mL) diluted in 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) by incubation overnight at 6°C. The plates were rinsed thrice with PBS-tween 20 (50 mM tris, pH 7.4, containing 150 mM sodium chloride and 0.05% tween 20) and non-specific immune sites were blocked by incubation for 1 h at 37°C with carbonate buffer and 8% nonfat dry milk. The control and evaluated sera were diluted (1:250) in PBS-tween 20 and 5% nonfat dry milk and 0.1 mL of this mixture was added to the wells of the microtitre plates in duplicate. Further, the plates were incubated for 1 h at 37°C. After rinsing, the antibodies and conjugates (Bethyl Lab, Montgomery, TX, USA) were diluted in PBS-tween 20 and 5% nonfat dry milk (HRP anti-cat IgG antibodies were diluted 1:20,000) after which 0.1 mL of the mixture was added to each well and incubated for

1 h at 37°. After rinsing, the peroxidase activity was revealed by adding 0.1 mL of 3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and the reaction was stopped by adding 0.1 mL of HCl 1N. The optical density (OD) was read at 450 nm in an ELISA microplate reader. For controls, positive and negative control sera were included in every plate and a corrected OD value was calculated according to the formula in (Garcia et al., 2007). A serum was considered to be positive when $OD_{corr} > [OD \text{ mean (from negative control sera, } n = 11) + 2SD \text{ (standard deviation from negative control sera)}]$.

3.2.8 – Statistics

The results were submitted to the analysis of variance (ANOVA), whereas values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3.3 – RESULTS

The cats that were immunized with the recombinant proteins (rROP2 and rHSP70) shed less oocysts in feces (Figure 1; Figure 2) than the groups G2 and G3. The G1 animals excreted less oocysts per gram of feces (OOPG: 7,110) when compared with G2 (OOPG: 19,110) and demonstrated a superior preventable fraction of 62.8% ($p < 0.05$). When compared with G3 (OOPG: 30,340), the preventable fraction was of 76.56% ($p < 0.05$). Animals from group G2 shed 37.02% less oocysts than G3 ($p = 0.88$). When comparing the total amount of oocysts shed, we can see that G1 had an even higher preventable fraction than G2 and G3: 70.71% and 80.40%, respectively ($p < 0.05$). Animals from G2 shed 33.10% less oocysts in total comparing with G3 ($p = 0.68$) (Figure 2).

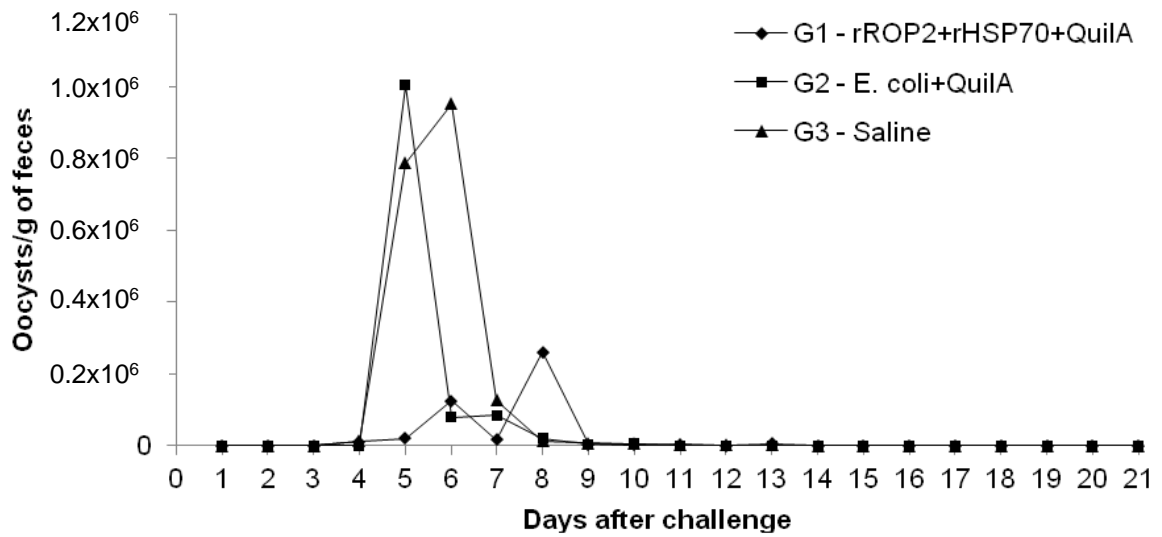


Figure 1: *Toxoplasma gondii* oocysts per gram of feces shed by a group of cats immunized with rROP2 and rHSP70 (G1), adjuvant and vector control (G2) and saline control (G3). The animals were challenged on day 72 with 600 tissue cysts of the TgDoveBr8 strain of *T. gondii*.

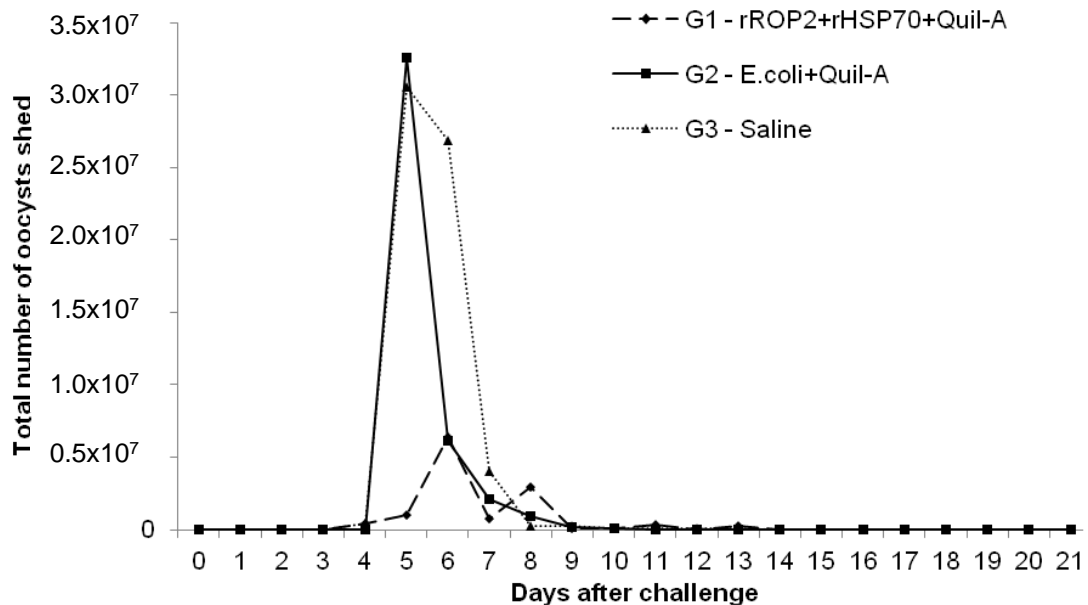


Figure 2: Total of *Toxoplasma gondii* oocysts shed by a group of cats immunized with rROP2 and rHSP70 (G1), adjuvant and vector control (G2) and saline control (G3). The animals were challenged on day 72 with 600 tissue cysts of the TgDoveBr8 strain of *T. gondii*.

The prepatent periods (PPP) from the groups G1, G2 and G3 were 4 days, 3.67 days and 3.33 days, respectively. The patent periods (PP) were 7 (G1), 7.33 (G2) and 7 days (G3). And the peak of oocysts excretion (POE) were on the 8th, 5th and 6th days (Table 02).

IgG antibody results are shown in Figure 3. None of the animals presented a higher antibody level before the challenge. All cats from G1, G2 and G3 seroconverted after the challenge. There were no significant statistical difference between the results of the groups ($p>0.05$).

Table 2: *Toxoplasma gondii* oocysts shedding parameters in cats immunized with rROP2+rHSP70+Quil-A and controls. The animals were challenged afterward with the TgDoveBr8 strain.

Groups	Prepatent period ¹	Patent Period ¹	Peak of oocysts excretion ¹	Oocysts shedding ²	Preventable fraction (%)	Preventable fraction (%)
G1	4	7	8	7,11	76.56	62.8
G2	3.67	7.33	5	19,11	37.02	Reference value
G3	3.33	7	6	30,34	Reference value	

1: Period in days.

2: Oocysts per gram of feces (OOPG) – mean of 21 days.

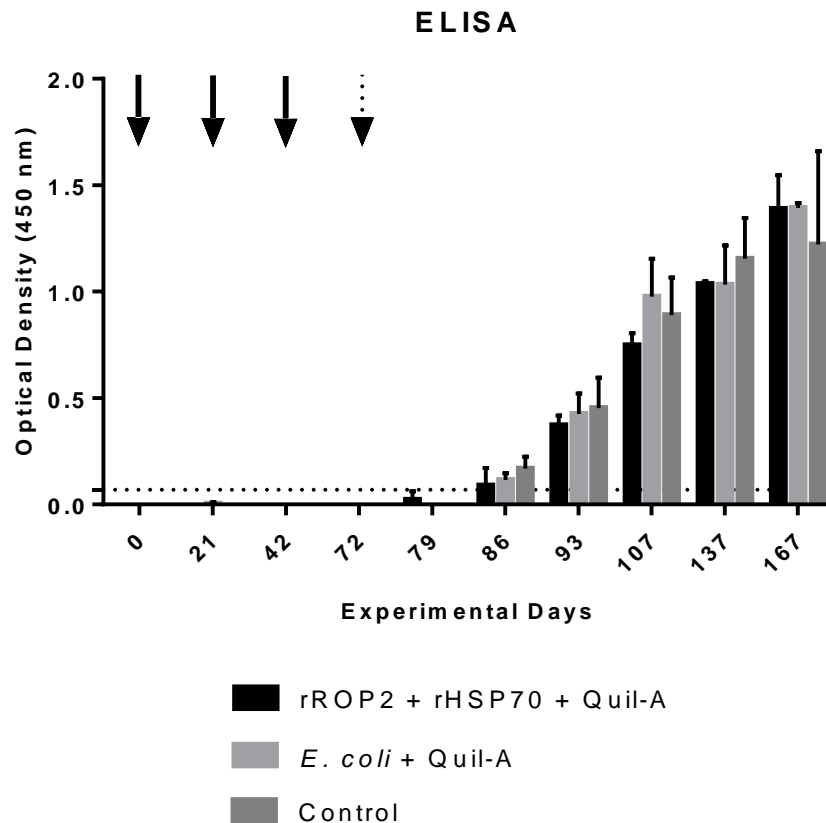


Figure 3: Cats sera IgG antibody response against *T. gondii* evaluated by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (MEAN \pm SD). Treatments were made at days 0, 21 and 42 (solid arrows). The challenge was performed with 600 tissue cysts of the TgDoveBr8 strain on 72th day (dashed arrow). Dashed line indicates a positive cut-off.

3.4 – DISCUSSION

In this study, we observed that intranasal immunization with rROP2 (*T. gondii*) plus rHSP70 (*E. tenella*), showed a partial protection against oocysts shedding (76.56%). The results of oocysts shedding showed that the animals that received adjuvant and vector control (G2) also had partial protection. However, cats from G1 excreted at least 62.8% less oocysts than G2. There are no previous studies using rROP2 and rHSP70 as a vaccine against oocysts shedding in cats.

Some studies have utilized a live strain (T-263) to evaluate oocysts shedding protection in cats and have described less production of *T. gondii* oocysts (Frenkel et al., 1991; Freyre et al., 1993; Mateus-Pinilla et al., 1999). Vaccination of susceptible animals with virulent or attenuated parasites has been a successful approach against several protozoan diseases (Schetters, 1995). However, because of the potential adverse effects and the difficulties to preserve live and attenuated vaccines, subunit vaccines made from native antigens of the parasite or recombinant proteins may surpass these problems (Jenkins, 2001).

Omata et al. (1996) vaccinated cats using tachyzoites irradiated with ^{60}Co and only 21.42% (3/14) of infected animals did not shed oocysts. Distinctively from our study, Mishima et al. (2002) did not get a reduction in oocysts shedding when using a DNA vaccine expressing ROP2. This could relate to the fact that they used a different route of administration. While we used the intranasal route, they used the systemic one. Garcia et al. (2007) used crude rhoptry proteins to immunize cats and reported that two out of three cats were protected against oocysts shedding. Another study using crude rhoptry of *T. gondii* obtained an effectiveness of 98.6% in oocysts shedding (Zulpo et al., 2012). The challenge from those studies were performed with different strains VEG and ME-49, respectively.

The risk of human contamination by *T. gondii* oocysts has been described (Jones et al., 2006; Santos et al., 2010). Jones et al. (2006) demonstrated that seropositivity to antibodies IgG and IgM anti-*T. gondii* in human populations residing in Erechim, southern Brazil, was correlated to an elevated risk of infection (OR>2.08) in individuals that had previous contact with soil. Santos et al. (2010) collected soil samples from playgrounds in elementary schools in the state of São Paulo and found that 22.58% (7/31) were positive for *T. gondii*. Therefore, it was concluded that *T. gondii* oocysts are widely distributed in areas of public schools in that region. Additionally, an outbreak of human toxoplasmosis was described in Santa Izabel do Ivaí, Brazil. Approximately 426 humans were infected and the source of contamination was probably the common access to water (Moura et al., 2006). Thereat, it is desirable that a vaccine efficiently reduces the oocysts shedding in cats, consequently preventing infections due to environmental contamination, as observed in this study.

In the present study we used the TgDoveBr8 strain, that was isolated from *Zenaida auriculata* in Brazil. This strain is genotype II and was not very pathogenic in mice, producing tissue cysts (Barros et al., 2014). The quantity of oocysts shed by cats infected with this strain was unknown, as also the peak of oocysts excretion (POE), PPP and PP. Comparing with ME-49, that is a well-known type II strain usually used to challenge cats (Dubey and Thulliez, 1989; Lappin et al., 1989; Burney et al., 1995; Dubey, 1995; Dubey et al., 1995; Zulpo et al., 2012), we can see some differences in those parameters. While Zulpo et al. (2012) showed that in ME-49 the POE, PP and PPP were 5 days approximately, 5 to 19 days and 3 to 7 days, respectively, in our study, the TgDoveBr8 values were 5 to 8 days (POE), 3 to 4 days (PP) and 7 days approximately (PPP).

The intranasal route was chosen based on studies that demonstrated that intranasal injection was an effective way of providing a disseminated mucosal antibody response, as well as systemic immunity (Debard et al., 1996). Whereas that the main route of host infection by *T. gondii* is oral, local immunity in the gut via lymphocytes and IgA is important in host resistance to the parasite (Bourguin, Chardes and Bout, 1993; Garcia et al., 2014).

Igarashi et al. (2010) showed that intranasal immunization can trigger both mucosal and systemic T and B-cell responses, so it can be used to target pathogens that invade far away from the immunization site, like the intestines.

We didn't observe a correlation between oocysts shedding and antibody production in this study. The fact that there is no correlation between circulating antibodies and intestinal immunity was previously described (Dubey and Frenkel, 1972). However, all cats seroconverted after the challenge.

3.5 – CONCLUSION

In conclusion, we observed that recombinant proteins plus Quil-A were able to partially reduce oocysts shedding in domestic cats immunized by the nasal route.

3.6 – REFERENCES

- BARROS, L.D.; TARODA, A.; ZULPO, D.L.; CUNHA, I.A.; SAMM, I. A.S.; CARDIM, S.T.; MIURA, A.C.; SU, C.; MACHADO, R.Z.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J.L. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23, 443-448, 2014.
- BENSAUDE, O.; BABINET, C.; MORANGE, M.; JACOB, F. Heat shock protein, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. **Nature**, 305, 331–333, 1983.
- BOGADO, A.L.G. Avaliação da imunidade protetora em frangos de corte vacinados com proteína recombinante rHSP70 de *Eimeria tenella*. **Tese – Universidade Estadual de Londrina**, 64, 2013.
- BOOTHROYD, J.C.; DUBREMETZ, J.F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Review Microbiology**, 6, 79-88, 2008.
- BOURGUIN, I.; CHARDES, 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. **Infection and Immunity**, 61, 2082–2088, 1993.
- BURNEY, D.P., LAPPIN, M.R., COOPER, C., SPILKER, M.M. Detection of *Toxoplasma gondii*-specific IgA in the serum of cats. **American Journal of Veterinary Research**, 56, 769–773, 1995
- CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, 10, 143-171, 1974.
- COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants-A classification and review of their modes of action. **Vaccine**, 15, 248-256, 1997.
- CUNHA, I.A.L.; ZULPO, D.L.; BOGADO, A.L.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; IGARASHI, M.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Qui-A. **Veterinary Parasitology**, 186, 216-221, 2012.
- DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma*: Implications for Public Health. **Zoonoses and Public Health**, 57, 34-52, 2010.
- DEBARD, N.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces

development of cerebral cysts after oral infection. **Infection and Immunity**, 64, 2158-2166, 1996.

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

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

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasma* of animals and man. **Boca Raton: CRC Press**, 1988.

DUBEY, J.P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 194, 1297–1299, 1989

DUBEY, J.P.; WEIGEL, R.M.; SIEGEL, A.M.; THULLIEZ, P.; KITRON, U.D.; MITCHELL, M.A.; MANNELLI, A.; MATEUS-PINILLA, N.E.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; TODD, K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology**, 81, 723-729, 1995.

FERRAZ, J.C.; STAVROPOULOS, E.; YANG, M.; COADE, S.; ESPITIA, C.; LOWRIE, D.B.; COLSTON, M.J.; TASCAN, R.E. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. **Infection and Immunity**, 72 6945–695, 2004.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidia oocysts. **Science**, 167, 893-896, 1970.

FRENKEL, J.K.; PFEFFERKORN, E.R.; SMITH, D.D.; FISHBACK, J.L. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal Veterinary Research**, 52, 759–763, 1991.

FREYRE, A.; CHOROMANSKI, L.; FISHBACK, J.L.; POPIEL, I. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, 79, 716–719, 1993.

GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; NAVARRO, I.T.; MACHADO, R.Z.; SINHORINI, I.L.; FREIRE, R.L.; MARANA, E.R.; TSUTSUI, V.; CONTENTE, A.P.; BEGALE, L.P. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, 129, 209-217, 2005.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; BIAZZONO, L.; FREIRE, R.L.; GUIMARÃES, J.S.J.; CRYSSAFIDIS, A.L.; BUGNI, F.M.; CUNHA, I.A.L.; HAMADA, F.N.; DIAS, R.C.F. Protective activity against shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of

the *Toxoplasma gondii* by intranasal route. **Veterinary Parasitology**, 145, 197-206, 2007.

GARCIA, J.L.; INNES, E.A.; KATZER, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Vaccine: Development and Therapy**, 2014, 23-37, 2014.

HEDSTROM, R.; CULPEPPER, J.; SCHINSKI, V.; AGABIAN, N.; NEWPORT, G. Schistosome heat-shock proteins are immunologically distinct host-like antigens. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 29, 275-282, 1988.

IGARASHI, M.; KANO, F. S.; 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 cysts formation in BALB/c mice. **Experimental Parasitology** 118, 386-392, 2008.

IGARASHI, M.; ZULPO, D.L.; CUNHA, I.A.L.; BARROS, L.D.; PEREIRA, V.F.; TARODA, A.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C.; JENKINS, M.C.; GARCIA, J.L. *Toxoplasma gondii*: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 19, 246-251, 2010.

INNES, E.A., BARTLEY, P.M., MALEY, S., KATZER, F., BUXTON, D. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104, 246-251, 2009.

JENKINS, M. C. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, 101, 291-310, 2001.

JONES, J.L.; MUCCIOLI, C.; BELFORT-JR, R.; HOLLAND, G.N.; ROBERTS, J.M.; SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 12, 582-587, 2006.

LAPPIN, M.R., GREENE, C.E., PRESTWOOD, A.K., DAWE, D.L., TARLETON, R.L. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii*: Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in the serum of cats. **American Journal of Veterinary Research**, 50, 1586–1590, 1989.

MAKINO, M.; UEMURA, N.; MORODA, M.; KIKUMURA, A.; PIAO, L.X.; MOHAMED, R.M.; AOSAI, F. Innate immunity in DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene that induces DC activation and Th1 polarization. **Vaccine**, 29, 1899–1905, 2011.

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. **Journal of Parasitology** 85, 855-860, 1999.

MISHIMA, M.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T. Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats. **Parasitology Research** 88, 144-149, 2002.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M., WADA, M.Y., JONES, J.L., TUBOI, S.H., CARMO, E.H., RAMALHO, W.M., CAMARGO, N.J., TREVISAN, R., GRAÇA, R.M., SILVA, A.J.; MOURA, I., DUBEY, J.P., GARRETT, D.O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, 12, 326–329, 2006.

NEWPORT, G.R.; HEDSTROM, R.C.; KALLESTAD, J.; TARR, P.; KLEBANOFF, S.; AGABIAN, N. Identification, molecular cloning, and expression of a schistosome antigen displaying diagnostic potential. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 38, 540-546, 1988.

OMATA, Y.; AIHARA, Y.; KANDA, M.; SAITO, A.; IGARASHI, I.; SUZUKI, N. *Toxoplasma gondii*: experimental infection in cats vaccinated with ⁶⁰Co-irradiated tachyzoites. **Veterinary Parasitology**, 65, 173–183, 1996.

PLANELLES, L.; THOMAS, M.C.; ALONSO, C.; LOPEZ, M.C. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. **Infection and Immunity**, 69, 6558-6563, 2001.

QAZI, K.R.; WIKMAN, M.; VASCONCELOS, N.M.; BERZINS, K.; STAHL, S.; FERNANDEZ, C. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of *Plasmodium falciparum* malarial antigen gene fused with a fragment of HSP70 gene. **Vaccine**, 23,1114-25, 2005.

RAHMAN; QK; BERZINS, K; LOPEZ, MC; FERNANDEZ, C. Breaking the non-responsiveness of C57BL/6 mice to the malarial antigen EB200-The role of carrier and adjuvant molecules. **Scandinavian Journal of Immunology**, 58, 395-403, 2003.

SAAVEDRA, R.; BECERILL, M.A.; DUBEAUX, C.; LIPPENS, R.; DE VOS, M.J.; HÉRION, P.; BOLLEN, A. Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP 2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, 64, 3858-3862, 1996.

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

SADAK, A.; TAGHY, Z.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J.F. Characterization of a family of rhopty proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 29, 203–211, 1988.

SANTOS, T.R., NUNES, C.M., LUVIZOTTO, M.C.R., MOURA, A.B., LOPES, W.D.Z., COSTA, A.J., BRESCIANI, K.D.S. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. **Veterinary Parasitology**, 171, 53-57, 2010.

SCHETTERS, T. Vaccine development from a commercial point of view. **Veterinary Parasitology**, 57, 267-275, 1995.

SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry** 256, 12111–12114, 1990.

SELKIRK, M.E.; DENHAM, D.A.; PARTONO, F.; MAIZELS, R.M. Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in *Brugian filariasis*. **Journal of Immunology**, 143, 299-308, 1989.

SILVA, N.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, D.A.; FERRO, E.A.; KASPER, L.H.; MINEO, J.R. Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein70 during in vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites. **Infection and Immunity**, 66, 3959–3963, 1998.

ZULPO, D.L.; HEADLEY, S.A.; BIAZZONO, L.; CUNHA, I.A.L.; IGARASHI, M.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; CARDIN, S.T.; BOGADO, A.L.G.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, 131, 223-230, 2012.

CONCLUSÕES

- As proteínas recombinantes rROP2 (*T. gondii*) e rHSP70 (*E. tenella*) promoveram proteção parcial nos gatos imunizados, em relação aos grupos controle.
- Não houve correlação entre a produção de anticorpos IgG e a eliminação de oocistos nos animais desafiados.