



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAUTON LUIZ ZULPO

**PROTEÇÃO CONTRA A ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS EM
FELINOS IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS
DO *Toxoplasma gondii***

Londrina
2010

DAUTON LUIZ ZULPO

**PROTEÇÃO CONTRA A ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS EM
FELINOS IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS
DO *Toxoplasma gondii***

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
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Z94p Zulpo, Dauton Luiz.
Proteção contra a eliminação de oocistos em felinos imunizados com proteínas
de Roptrias do *Toxoplasma gondii* / Dauton Luiz Zulpo. – Londrina, 2010.
46 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,
2010.
Inclui bibliografia.

1. Toxoplasma gondii – Teses. 2. Toxoplasmose em animais – Teses. 3. Vacina
veterinária – Teses. 4. Imunologia veterinária – Teses. 5. Protozoologia – Teses.
6. Gato como animal de laboratório – 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

DAUTON LUIZ ZULPO

**PROTEÇÃO CONTRA A ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS EM FELINOS
IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS DO *Toxoplasma
gondii***

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

Prof. Dr. João Luis Garcia
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani
UNESP – Araçatuba - SP

Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro
UEL – Londrina - PR

Londrina, 26 de Fevereiro de 2010.

*Agradeço a Deus pela vida,
Agradeço aos meus pais pelo objetivo de vida e
Agradeço aos amigos por todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Danilo Luiz** e **Ana Assunta** pelo amor e apoio em todos os momentos dessa minha caminhada.

Aos meus familiares **Glederson Luiz**, **Dauana**, **Simone** e **Ana Luiza** pelo amor, admiração e atenção.

Ao meu orientador Prof. Dr. **João Luis Garcia**, pelos ensinamentos e paciência em todos esses anos de trabalho em conjunto.

A Profa. Dra. **Katia Denise Saraiva Bresciani**, pela disposição, auxílio e conhecimentos indispensáveis nas correções desse trabalho.

Aos Professores Doutores **Italmar Teodorico Navarro**, **Luciane Biazzone-Nabut** e **Roberta Lemos Freire** pelos ensinamentos e ajuda nesta pesquisa.

A agora, Profa. Dra. **Michelle Igarashi**, por todos os conhecimentos e ajuda sem negar esforços para o bem do nosso projeto.

As Técnicas do Laboratório de Protozoologia e Zoonoses **Elizabete Marana** e **Beatriz Nino**, por todo carinho e ajuda oferecida em todos os momentos desse projeto e ao ex-Técnico do Laboratório de Zoonoses **Ademir da Silva** pela amizade e disposição em auxiliar em várias fases desse trabalho.

Aos meus companheiros de trabalho **Ivo Alexandre Leme da Cunha**, **Fernanda de Rizzo**, **Maria Paula Ewald** e **Luis Daniel de Barros**, pela amizade e ajuda incomparável prestada a mim em todo experimento.

Aos residentes **Alessandra Taroda** e **Fernando Hamada**, pela ajuda e atenção em todos os momentos desse estudo.

Aos amigos da residência **João Henrique**, **Marcos Cezar**, **Camila Matias** e **Flavia Navas**, pelo apoio e amizade nesse período.

Aos amigos do mestrado **Elaine Longhi**, **Adriana Leticia**, **Marcela Gasparini**, **Leticia da Costa**, **Elis Lorenzetti**, **Fernando Vieira** e **Nelson Parizotto** pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

Aos estagiários **Giovana**, **Jonatas**, **Júnior**, **Vanessa**, **Carol**, **Hannah**, **Milaine** e os demais alunos que colaboraram em todos os momentos do projeto.

ZULPO, Dauton Luiz. **Perspectivas de vacinas em felinos contra o *Toxoplasma gondii* e proteção contra a eliminação de oocistos em felinos imunizados com proteínas de roptrias do *Toxoplasma gondii***. 46 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Um dos maiores surtos de toxoplasmose ocorreu no Brasil, em Santa Isabel do Ivaí-PR, onde, aparentemente, uma única gata com seus filhotes contaminaram o manancial de água da cidade, o que levou a infecção em mais de 500 pessoas com as formas congênita e ocular. O *Toxoplasma gondii* é um protozoário que pode infectar mais de 380 espécies de animais, inclusive o homem, tendo como hospedeiro definitivo os felídeos. Atualmente, não existe nenhuma vacina comercialmente disponível para gatos, porém, esta seria importante para impedir a eliminação de oocistos e, conseqüentemente, diminuir a contaminação ambiental. O desenvolvimento de vacinas tem sido baseado na observação de que a exposição primária ao *T. gondii* resulta em completa resistência contra infecções subsequentes. O desenvolvimento de vacinas não infectantes tais como vacinas de subunidades, vacina de DNA, assim como, vacinas com proteínas do *T. gondii*, devem ser estimulados. O presente trabalho teve como foco principal revisar a literatura a respeito de vacinas contra o *T. gondii* em gatos. Como parte experimental, nosso estudo objetivou isolar e caracterizar antigenicamente as roptrias do *T. gondii*, avaliar a resposta imune humoral e celular em gatos imunizados pela via nasal e retal e finalmente avaliar a proteção contra a eliminação de oocistos do *T. gondii* nas fezes dos felinos. Para avaliar a imunogenicidade, foi testado o imunizante intranasal com proteínas de roptrias do *T. gondii* associado ao adjuvante Quil-A em felinos. Durante o estudo foram utilizados 25 gatos, divididos em cinco grupos. G1 e G3 receberam proteínas de roptrias mais Quil-A pela via nasal e retal respectivamente. G2 e G4 receberam soro albumina bovino mais Quil-A igualmente pela via nasal e retal, e G5 permaneceu como controle. As doses foram realizadas nos dias 0, 21, 42, e 63. O desafio foi realizado com 800 cistos da cepa ME-49 no dia 70. Foi realizada a Técnica de Sheatter para verificar a eliminação de oocistos dos felinos, os níveis de anticorpos de IgM e IgG dos soros foram avaliados por meio do ensaio imunoenzimático indireto. No dia do desafio, dois animais do G1, e três do G3 tiveram níveis de anticorpos IgG acima do ponto de corte, quanto aos anticorpos da classe IgM no dia do desafio dois animais do G1 apresentaram níveis acima do ponto de corte e nenhum do G3. A resposta imune humoral avaliada nos soros não foi correlacionada com a eliminação de oocistos nas fezes. A eliminação de oocistos foi 98,4%; 87,5%; 53%, e 58% menor do que o grupo controle (G5), respectivamente nos grupos G1, G2, G3, e G4. A vacina de roptrias nasal e retal apresentaram proteção parcial em gatos quando desafiados com cistos do *T. gondii*, entretanto, a via nasal foi mais eficaz.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*. Hospedeiro definitivo. Roptrias. Vacina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Determinação da Resposta de Anticorpos IgA do Conteúdo Intestinal dos Felinos Através do ELISA.....	34
Figura 2 – Determinação da Resposta de Anticorpos IgM do Soro dos Felinos Através do ELISA.....	35
Figura 3 – Determinação da Resposta de Anticorpos IgG do Soro dos Felinos Através do ELISA.....	36
Figura 4 – Resposta Proliferativa de Linfócitos do Sangue Periférico Estimulados com Antígenos do <i>T. gondii</i>	37
Figura 5 – Eliminação de Oocistos em Felinos Desafiados com Cistos de <i>T. gondi</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Imunização e Desafio dos Felinos.....	30
Tabela 2 – Eliminação Média de Oocistos em Felinos.....	38

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – PERSPECTIVAS DE VACINAS EM FELINOS CONTRA O	
<i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.1 RESUMO.....	10
1.2 ABSTRACT.....	10
1.3 INTRODUÇÃO.....	11
1.4 RESPOSTA IMUNE.....	13
1.5 ROPTRIAS.....	15
1.6 VACINAS EM GATOS.....	16
1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
1.8 REFERÊNCIAS.....	19
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO 2 – PROTEÇÃO CONTRA A ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS EM	
FELINOS IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS	
DO <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.1 RESUMO.....	26
2.2 ABSTRACT.....	26
2.3 INTRODUÇÃO.....	27
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.4.1 Amostras do <i>Toxoplasma gondii</i>	28
2.4.2 Obtenção de Proteínas de Roptrias.....	29
2.4.3 Obtenção e Quantificação de Cistos de <i>T. gondii</i>	29
2.4.4 Vacinação e Desafio dos Felinos.....	29
2.4.4.1 Animais	29
2.4.4.2 Imunização e Desafio	30
2.4.5 Amostras Biológicas de Sangue e Obtenção de Soro	30
2.4.6 Amostras Biológicas de Fezes para Dosagem de IgA Intestinal.....	31
2.4.7 Amostras Biológicas de Fezes e Contagem de Oocistos	31

2.4.8	Ensaio Imunoenzimático Indireto - ELISA.....	31
2.4.9	Proliferação de Linfócitos.....	32
2.4.10	Análise Estatística	33
2.5	RESULTADOS	33
2.5.1	Produção e Purificação das Roptrias.....	33
2.5.2	Avaliação da Resposta Imune Intestinal Induzida pela Imunização com as Proteínas de Roptrias através do ELISA.....	33
2.5.3	Avaliação da Resposta Imune Humoral Induzida pela Imunização com as Proteínas de Roptrias através do ELISA.....	34
2.5.4	Avaliação da Resposta Imune Celular Induzida pela Imunização com as Proteínas de Roptrias.....	37
2.5.5	Eliminação de Oocistos.....	37
2.6	DISCUSSÃO.....	40
2.7	REFERÊNCIAS.....	43
3	CONCLUSÃO.....	46

CAPÍTULO 1

PERSPECTIVAS DE VACINAS EM FELINOS CONTRA O *Toxoplasma gondii*

ZULPO, Dauton Luiz. **Perspectivas de vacinas em felinos contra o *Toxoplasma gondii***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

1.1 RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de animais, inclusive o homem. Tem como hospedeiro definitivo os felídeos. Atualmente, não existe nenhuma vacina comercial disponível para gatos, porém, esta seria importante para impedir a eliminação de oocistos e, conseqüentemente, diminuir a contaminação ambiental. O desenvolvimento de vacinas tem sido baseado na observação de que a exposição primária ao *T. gondii* resulta em completa resistência contra infecções subsequentes. A Toxovax[®] é a única vacina comercial contra a toxoplasmose, a qual é indicada no controle de perdas reprodutivas em ovinos e caprinos. Esta vacina é composta de taquizoítos vivos que perderam a capacidade de formar cistos teciduais nestas espécies. Alguns inconvenientes desta vacina são: o risco de reversão da virulência, ser infectante para seres humanos, bem como, não impedir a infecção fetal. Desta forma, o desenvolvimento de vacinas não infectantes tais como vacinas de subunidades, vacina de DNA, assim como, vacinas com proteínas do *T. gondii*, devem ser estimulados. O presente trabalho é uma revisão de vacinas contra o *T. gondii*, principalmente aquelas direcionadas ao controle da toxoplasmose em felinos.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*. Gatos. Roptrias. Vacina.

ZULPO, Dauton Luiz. **Vaccines Prospects in Cats Against *Toxoplasma gondii***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

1.2 ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan able to infect a wide variety of animals, including human beings. Cats are definitive host currently, there is no commercial vaccine for cats, however this vaccine should be very important to prevent oocysts shedding and, consequently, reduce environmental contamination. The development of vaccines has been based on the observation of the primary exposure to *T. gondii* results in a complete resistance against subsequent infection. Toxovax[®] is the only commercial vaccine against toxoplasmosis, and it is indicated in the control of reproductive losses in sheep and goats. This vaccine consists of live tachyzoites that have lost the ability to form tissue cysts in these species. Some

disadvantages of this vaccine are: the risk of reversion of virulence to be infectious or humans and does not prevent fetal infection. Thus, the development of non-infective vaccines such as subunit vaccines, DNA vaccine, as well as vaccines with native proteins of *T. gondii*, should be encouraged. This study focused on a review of vaccines against *T. gondii*, especially those aimed to control of toxoplasmosis in cats.

Key words: *Toxoplasma gondii*. Cats. Crude rhoptries. Vaccine.

1.3 INTRODUÇÃO

Primeiramente descrito por Splendore (1908) onde isolou o parasita em um coelho de laboratório em São Paulo, classificando-o como *Toxoplasma cuniculli*. Posteriormente Nicolle & Manceaux (1908) no Instituto Pasteur de Túnis na Tunísia descreveram em um roedor (*Ctenodactylus gundi*) da África do Sul, e classificaram inicialmente como *Leishmania gondii* e em 1909, reclassificaram como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909).

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *T. gondii*, sendo uma das doenças mais comuns no homem e em outros animais de sangue quente (DUBEY & BEATTIE, 1988). O *T. gondii* é considerado um dos parasitos de melhor adaptação e entre seus hospedeiros incluem-se, vertebrados aéreos (pássaros), mamíferos marinhos (baleias e golfinhos), herbívoros e carnívoros terrestres (roedores, animais de caça, animais de produção e o homem), não possui restrição geográfica. (CARRUTHERS, 2002). Este parasita pertence ao filo Apicomplexa, subclasse Coccídia, Família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, espécie *Toxoplasma gondii* (MONTROYA & LIESENFELD 2004).

O *T. gondii* é um eucarionte, estruturalmente, formado por uma membrana externa, anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de golgi, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, microporo e um núcleo com parede bem definida (METSIS & PETERSEN, 1995). Este coccídeo devido as suas características biológicas, tais como pela sua capacidade de invasão celular, multiplicação em grande número de hospedeiros e células, tem sido utilizado como importante modelo de estudo biológico do filo Apicomplexa (ROOS et al., 1999).

Até a década de 30 apenas os estágios assexuados (taquizoito e bradizoito) do *T. gondii* eram conhecidos. Evidências da característica coccidiana

foram observadas somente no final da década de 60, revelando similaridade entre os merozoítos extra-intestinais e intestinais da *Eimeria* (TENTER et al., 2000).

Apesar de ter sido identificado no começo do século XX, apenas no início da década de 70 é que foram descritos os hospedeiros definitivos e intermediários (FRENKEL et al., 1970; MILLER et al., 1972).

A disseminação da infecção no ser humano é favorecida pela alta prevalência da infecção em espécies de animais domésticos e selvagens, principalmente nos ovinos e suínos (NAVARRO et al., 1992). O risco em adquirir a infecção por meio de consumo de carnes cruas ou mal cozidas, fato comum em várias regiões do Brasil, é relatada por Vidotto et al. (1990). A toxoplasmose tem sido encontrada em várias áreas geográficas do mundo, atingindo perto de um terço da população humana (DUBEY & BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000).

Há três estágios de infecção por *T. gondii*: taquizoítos (livres e em grupos), bradizoítos (cistos em tecidos) e esporozoítos (ocistos) (DUBEY, 2004). O parasita é intracelular obrigatório e possui a capacidade de invadir uma enorme variedade de células, tecidos e hospedeiros (LINDSAY & CARRUTHERS, 1999), porém os gatos domésticos e felídeos selvagens são os únicos hospedeiros definitivos do parasita (FRENKEL et al., 1970), ou seja, os únicos a eliminarem ocistos por meio das fezes. No epitélio intestinal dos felídeos ocorre a fase de esquizogonia. Nessa multiplicação, por gametogênese são formados os macrogametas (femininos) e microgametas (masculinos), culminando com a formação dos ocistos (DENKERS, 1999). Os gatos podem eliminar ocistos após a ingestão de taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos. Porém, no máximo 62% dos gatos conseguem completar o ciclo enteroepitelial após a ingestão de taquizoítos ou ocistos comparado à ingestão de bradizoítos (DUBEY & FRENKEL, 1972; DUBEY, 2005).

Os ocistos são eliminados através das fezes na forma não esporulada (não infectante). A esporulação ocorre no meio ambiente entre um a cinco dias dependendo das condições de temperatura e umidade (DUBEY et al., 1998).

Os hospedeiros intermediários, incluindo os gatos, podem adquirir o *T. gondii* pela ingestão de tecidos de animais infectados com cistos, alimentos ou água contaminados com ocistos esporulados, ou por transmissão transplacentária. Após a ingestão, os bradizoítos ou esporozoítos são liberados dos cistos ou dos

oocistos e invadem o tecido intestinal, transformam-se em taquizoitos, multiplicam-se localmente e se disseminam por todo o organismo pela via hematogênica. Com o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro os taquizoitos encistam-se nos tecidos e a última geração destes darão origem aos bradizoitos, que se multiplicam lentamente após a formação de cistos teciduais. Estes cistos são evidenciados em diversos órgãos, principalmente, no sistema nervoso central (SNC), olhos, musculatura esquelética e cardíaca. Na maioria das espécies de hospedeiros intermediários estes cistos podem persistir por toda a vida (DUBEY et al. 2004).

1.4 RESPOSTA IMUNE

A infecção por *T. gondii* raramente apresenta sinais clínicos no hospedeiro, no entanto, a severidade da doença, quando esta ocorre, está relacionada à espécie, idade do hospedeiro, hormônios sexuais, prenhez, estado imunológico, condição nutricional, estágio e amostra do parasita e infecções concomitantes (LUFT & REMINGTON, 1992; DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1994; LIESENFELD et al., 2001; DUBEY & JONES 2008). Os mecanismos envolvidos na proteção do hospedeiro contra a infecção são a resposta imune humoral e celular (GARCIA, 2009).

O número de hospedeiros acometidos pelo *T. gondii* é muito grande, contudo têm-se demonstrado que algumas espécies (ratos e galinhas) exibem um alto grau de resistência natural. A idade é outro fator importante para a resistência natural, animais jovens, nas diferentes espécies, apresentam-se mais susceptíveis à infecção (DUBEY, 1993).

A resposta do hospedeiro ao *T. gondii* está relacionada a resistência natural (inata) e adquirida (adaptativa). As diferenças de virulência entre as cepas do parasita são importantes na resistência do hospedeiro sendo que a base molecular dessas diferenças permanece desconhecida. Três linhagens clonais do *T. gondii* são reconhecidas e correlacionadas com a virulência do parasita. A linhagem tipo 1 está associada à virulência na fase aguda em camundongos, a linhagem tipo 2 na indução da fase crônica e a linhagem tipo 3 é a menos virulenta (ALEXANDER e HUNTER, 1998).

Após a fase aguda, o hospedeiro desenvolve uma boa imunidade que é duradoura e protetora para reinfecções, e na fase crônica os parasitas

permanecem em cistos teciduais. 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 da célula do hospedeiro, uma vez que a produção máxima de anticorpos coincide com o desaparecimento de taquizoítos viáveis (FRENKEL, 1990; WASTUNG et al., 1995).

Acreditava-se que a imunidade para o *T. gondii* fosse dependente da infecção crônica, pela persistência dos cistos teciduais e estímulo antigênico, contudo estudos com a cepa TS-4 (não cistogênica) demonstraram imunidade estéril, sem a presença da infecção crônica (FRENKEL, 1990), o que é estimulante para estudos com vacinas inativadas. Isoladamente a resposta humoral não é suficiente para promover proteção no hospedeiro, provavelmente devido a localização intracelular do parasita. Vários autores têm demonstrado a importância da resposta celular na imunidade do agente (FRENKEL, 1990; SHER & COFFMAN, 1992; BUXTON; 1993).

A principal porta de entrada do *T. gondii* é a via oral, sendo que nos herbívoros os oocistos são a principal via de transmissão. Portanto a imunidade local via linfócitos e IgA são de fundamental importância na proteção contra o parasita (BOURGUIN et al. 1993; VELGE-ROUSSEL et al., 2000). Neste sentido, tentando uma proteção contra a infecção oral, Igarashi et al. (2008) usaram proteínas recombinantes (ROP2, GRA5 e GRA7) mais a toxina colérica (adjuvante de mucosa) administradas pela via nasal, e observaram uma proteção contra a formação de cistos cerebrais em camundongos.

Chardés et al. (1990) descreveram que a infecção toxoplásmica ocorre principalmente pela via oral e induz secreção de IgA no intestino que podem iniciar a função protetora contra o parasita. A imunidade de mucosa tem revelado proteção em outros coccídeos intestinais pela inibição da penetração intestinal, portanto um estímulo eficiente da resposta imune de mucosa será de grande valor para o controle da toxoplasmose oral (CHARDÉS & BOUT, 1993).

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

A via nasal foi descrita como uma rota capaz de estimular a imunidade celular local e sistêmica, além do mais, esta via requer menos antígenos para promover a imunidade do que a via oral, pois a atividade proteolítica na via nasal é muito menor do que na via oral (VELGE-ROUSSEL et al., 2000). Considerando que a porta de entrada natural do *T. gondii* é a superfície de mucosa do intestino e que a uma infecção adquirida naturalmente gera uma imunidade protetora persistente, isso aponta à importância do desenvolvimento de uma vacina que estimule a proteção de mucosa (BONENFANT et al., 2001).

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

1.5 ROPTRIAS

Atualmente a maioria dos antígenos potenciais para o desenvolvimento de vacina contra o *T. gondii* e para outros Apicomplexa são aqueles segregados de superfície que parecem ser essenciais para o processo de invasão do parasita a célula hospedeira animal. Roptrias são organelas secretoras do protozoário e seus produtos da secreção são grandes candidatos vacinais (DLUGONSKA, 2008).

As roptrias estão em número de 8-12 por parasita e ocupam 10-30% do volume total da célula (SHAW et al., 2002) e são responsáveis por formar dentro da célula do hospedeiro o vacúolo parasitóforo (VP). As proteínas de roptrias no VP formam uma membrana híbrida que impede a degradação do *T. gondii* pela maquinaria da célula hospedeira e permite a propagação intracelular do parasita (DLUGONSKA, 2008).

Proteínas de roptrias têm sido descritas como candidatas a vacina contra o *T. gondii*. Devido a isso Garcia et al. (2005) e Garcia et al. (2007) utilizaram esse antígeno para imunizar suínos e felinos contra a formação de cistos teciduais, e eliminação de oocistos, respectivamente.

Trabalhos realizados utilizando as proteínas de roptrias focalizam na maior parte o antígeno protéico ROP2, membro proeminente da família das

proteínas das roptrias (DLUGONSKA, 2008). Durante a infecção humana com o *T. gondii* o antígeno ROP2 promove uma resposta humoral que envolve os marcadores IgA, IgM e IgG de fase aguda, assim como os anticorpos de fase crônica IgG (MARTIN et al., 1998). Saavedra et al. (1996) encontrou três potenciais epítomos no antígeno ROP2 reconhecidos por células T humanas.

Nakkar et al. (2003) mostraram que a proteína ROP2 do *T. gondii* é importante para a biogênese e manutenção da estrutura das roptrias, responsável pela invasão do parasita, replicação e interação com a célula hospedeira. A proteína ROP2 é detectada igualmente em todos os três estágios do parasita (SADAK et al., 1988). A diminuição na habilidade da invasão de taquizoitos da cepa RH do *T. gondii* foi observada pelo uso de anticorpos in vitro anti-ROP2 (MISHIMA et al. 2002).

Igarashi et al. (2008) observaram uma eficácia de quase 60% contra a formação de cistos em cérebro de camundongos imunizados pela via nasal com proteínas recombinantes ROP2. Dziadek et al. (2009) avaliaram a eficácia de uma vacina de subunidade de ROP2 e ROP4 recombinante. Os camundongos foram imunizados com três doses pela via subcutânea. Os autores mostraram que ambos os antígenos geraram resposta Th1/Th2 e uma redução de cistos cerebrais em torno de 46% foi observado no grupo imunizado.

Roptrias contêm muitas das moléculas chaves que são usadas para a entrada do parasita nas células hospedeiras. A família ROP2 é extensiva e altamente importante, sendo que estas proteínas interagem entre si na adesão à célula do hospedeiro (BOOTHROUND & DUBREMETZ, 2008).

1.6 VACINAS EM GATOS

Os gatos são considerados a chave no controle do *T. gondii*, devido ao fato desses animais serem os hospedeiros definitivos e eliminarem milhares de oocistos pelas fezes, sendo responsáveis pela propagação ao meio ambiente. Uma vacina nesta espécie deveria evitar ou diminuir a eliminação de oocistos. Contudo, existem poucos estudos com vacinas para o controle da eliminação de oocistos, considerados fundamentais para o controle e disseminação do *T. gondii* (DUBEY, 1996; GARCIA, 2009).

Até o momento não existem vacinas comerciais para a toxoplasmose humana (GOTTSTEIN, 1995). Para os animais existe uma única

vacina comercial para uso em ovelhas (Toxovax[®]), que está disponível na Grã Bretanha e Nova Zelândia, e utiliza taquizoitos da cepa S-48, que não persistem nos tecidos, reduzindo a perda reprodutiva em ovelhas (BUXTON et al., 1993).

Nas últimas décadas houve um grande aumento no número de técnicas e pesquisas imunológicas para a produção de novos imunógenos. As vacinas são classificadas em três grupos, as vivas (virulentas ou atenuadas), as de subunidades e as genéticas. As vacinas de subunidades e genéticas apresentam como vantagem serem incapazes de replicar no hospedeiro e de reversão de virulência, não sendo transmissíveis para outros indivíduos (KALINNA, 1997). As vacinas vivas normalmente estimulam tanto a resposta imune humoral quanto a celular (BABIUK, 2002).

Os felinos ainda filhotes são os principais disseminadores do *T. gondii*, podendo eliminar, após a prima-infecção com bradizoitos mais, de 10^8 oocistos nas fezes. Depois disso, a maioria dos felinos desenvolvem imunidade protetora e não eliminam mais oocistos se ocorrer uma reinfecção (FRENKEL et al., 1991).

Frenkel & Smith (1982), estudaram a eliminação de oocistos e a imunidade em 75 felinos inoculados previamente com os três estágios do *T. gondii*. Estes autores obtiveram uma proteção contra a eliminação de oocistos de 93% nos gatos que tinham eliminado oocistos previamente, 25% de proteção naqueles que desenvolvem somente anticorpos, e nenhuma proteção nos gatos que não eliminaram oocistos e não apresentaram título de anticorpos. No mesmo estudo, estes autores utilizaram taquizoitos inativados, e apenas um de 24 gatos testados não eliminou oocistos.

Frenkel et al. (1991) verificaram uma proteção parcial utilizando uma vacina viva contendo bradizoitos de uma cepa mutante do *T. gondii* a T-263 (não forma oocistos em gatos). Durante as inoculações não houve a eliminação de oocistos, porém, quando estes gatos foram desafiados com um isolado normal do *T. gondii*, os autores observaram uma eliminação de oocistos nas fezes de seis dos 37 felinos, portanto uma eficácia de 84% foi relatada. Gatos que receberam cistos teciduais intactos e bradizoitos livres da cepa T-263 soroconverteram após a imunização e nenhum deles eliminaram oocistos nas fezes após desafio com cistos teciduais de uma cepa virulenta (FREYRE et al., 1993). Em uma segunda etapa, dois grupos foram imunizados com taquizoitos da cepa T-263 pela via intraduodenal,

e obtiveram uma eficácia de 29% após o desafio. Outro estudo para determinar a eficácia desta cepa T-263 em felinos foi realizado a campo e reduziu a exposição de suínos ao *T. gondii* (MATEUS-PINILLA et al., 1999). Uma desvantagem dessas vacinas é que ela utiliza bradizoitos vivos do *T. gondii*, o que apresenta problemas de criopreservação, bem como, problemas de infecção em outras espécies (DUBEY, 1995).

Omata et al. (1996) testaram uma vacina em gatos com taquizoitos irradiados com ^{60}Co da cepa Beverley que impediu parcialmente a eliminação de oocistos, onde 43% não eliminaram oocistos quando desafiados com cistos cerebrais da mesma cepa. No mesmo estudo outro grupo foi vacinado com taquizoitos irradiados, porém da cepa RH, estes quando desafiados com a cepa Beverley, todos eliminaram oocistos.

Alternativamente, uma vacina de DNA que expressa a proteína ROP2 foi testada em felinos. A imunização dos gatos com a vacina de DNA expressando a rROP2 induziu a produção de IgG sérica e reduziu a quantidade de cistos no cérebro dos gatos, porém, a ROP2 não foi eficaz na diminuição da eliminação de oocistos nas fezes (MISHIMA et al., 2002).

Garcia et al. (2007) testaram uma vacina de roptrias incorporadas ao Quil-A pela via nasal para imunizar felinos com objetivo de diminuir a eliminação de oocistos, estes pesquisadores obtiveram uma eficácia de 67 % de gatos não eliminando oocistos nas fezes.

1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias para reduzir a transmissão da toxoplasmose incluem práticas de manejo e uma possível vacinação. A vacinação tem como objetivo reduzir os danos fetais, o número de cistos teciduais, além de prevenir a formação de oocistos em felinos (DUBEY, 1996).

Atualmente tem-se trabalhado com a possibilidade da utilização de vacinas de DNA para várias doenças como a malária, criptosporidiose, leishmaniose e toxoplasmose. A primeira geração de vacinas foi aquelas que utilizaram antígenos atenuados ou mortos, a segunda geração compreende as vacinas de subunidade (proteínas purificadas ou recombinantes) e as vacinas de ácido nucleico são conhecidas como de terceira geração (KALINNA, 1997).

O uso de vacinas pela mucosa associadas a adjuvantes apropriados podem induzir uma resposta imune tanto local como sistêmica (VELGE-ROUSSEL et al., 2000). Esta via tem sido utilizada com sucesso para diminuir a formação de cistos teciduais em camundongos (IGARASHI et al., 2008) e na diminuição da eliminação de oocistos por gatos (GARCIA et al., 2007).

1.8 REFERÊNCIAS

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

BABIUK, L. A. Vaccination: a management tool in veterinary medicine. **The Veterinary Journal** 164, 188-201, 2002.

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.

BOOTHROUD, J. C. & DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature reviews microbiology** 6, 79-88, 2008.

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** May, 1240-1246, 1990.

DENKERS, E. Y. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection** 1, 699-708, 1999.

DLUGONSKA, H. Toxoplasma rhoptries: Unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 2008, 1-7, 2008.

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—a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology** 126, 57-72, 2004.

DUBEY, J.P. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: In vivo stage conversion and strain variation. Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology** 133, 289-298, 2005.

DUBEY, J. P. & FRENKEL, J. K. Extra-Intestinal stages of *Isospora felis* and *I. rivolta* (Protozoa: Eimeriidae) in cats. **Journal of Protozoology** 19, 89-92, 1972.

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

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.; 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.

DUBEY, J. P., NAVARRO, I. T., SREEKUMAR, C., DAHL, E., FREIRE, R. L., KAWABATA, H. H., VIANNA, M. C. B., KWOK, O. C. H., SHEN, S. K., THULLIEZ, P., LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology** 90, 721–726, 2004.

DZIADEK, B.; GATKOWSKA, J.; BRZOSTEK, A.; DZIADEK, J.; DZITKO, K. DLUGONSKA, H. *Toxoplasma gondii*: The immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. **Experimental Parasitology** 123, 81-89, 2009.

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. & SMITH, D. D. Immunization of cats against shedding of *Toxoplasma* oocysts. **Journal of Parasitology** 38, 744-748, 1982.

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. 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.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T.; MACHADO, R. Z.; SINHORINI, I. L.; FREIRE, R. L.; MARANA, E. R. M.; TSUISUI, V.; CANTENTE, A. P. A.; BEGALE, L. 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.

GOTTSTEIN, B. *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz Medical Wochenschr** 65, 89S-95S, 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.

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.
- MARTIN, V.; ARCAVI, M.; SANTILLAN, G.; AMENDOEIRA, M. R. R.; DE SOUSA NEVES, E.; GRIEMBERG, G.; GUARNERA, E.; GARBERI, J. C.; ANGEL, S. O. Detection of human *Toxoplasma*-specific immunoglobulins A, M e G with a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 protein. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 5, 627-631, 1998.
- 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. & PETTSERSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology** 81, 472-479, 1995.
- MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal of Parasitology** 58, 928-937, 1972.
- 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.
- MONTOYA, J. G. & LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Seminars** 363, 1965-1976, 2004.
- NAKKAR, V.; NGO, H. M.; AARONSON, E. P.; COPPENS, I.; STEDMAN, T. T.; JOINER, K. A. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science** 116, 2311-2320, 2003.
- 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.
- ROOS, D. S.; CRAWFORD, M. J.; DONALD, R. G.; FOHL, L. M.; HAGER, K. M.; KISSINGER, J. C.; REYNOLDS, M. G. ; STRIEPEN, B.; SULLIVAN, W. J. Transport and trafficking: *Toxoplasma* as a model for *Plasmodium*. **Novartis Foundation Symposium** 226, 176-198, 1999.
- SAAVEDRA, R.; DE MEUTER, F.; DECOURT, J. L.; HERION, P. Human T-cell clone identifies a potentially protective 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.
- SADAK, A.; TAGHY, Z.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 29, 203-212, 1988.
- SHAW, M. K.; ROOS, D. S.; TILNEY, L. G. Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection** 4, 119-132, 2002.
- 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. A.; 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.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli: incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uomo. **Rev. Soc. Sci. São Paulo** 3, 109-112, 1908.
- 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 in both NALT and GALT compartments. **Infection and Immunity** 68, 969-972, 2000.
- VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L.; MITSUKA, R. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina –Pr. **Semina: Ciências Agrárias** 11, 53-59, 1990.

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.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a proteção contra a eliminação de oocistos em felinos imunizados pela via nasal e retal com uma vacina contendo roptrias do *Toxoplasma gondii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e caracterizar antigenicamente as roptrias do *T. gondii*.

Avaliar a resposta imune humoral e celular em gatos imunizados pela via nasal e retal.

Avaliar a proteção contra a eliminação de oocistos do *T. gondii* nas fezes dos felinos.

Avaliar a eliminação de oocistos da cepa ME-49.

CAPÍTULO 2

PROTEÇÃO CONTRA A ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS EM FELINOS IMUNIZADOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS DO *Toxoplasma gondii*

ZULPO, Dauton Luiz. **Proteção contra a eliminação de oocistos em felinos imunizados com proteínas de Roptrias do *Toxoplasma gondii***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

2.1 RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi testar uma vacina nasal e retal com proteínas de roptrias do *Toxoplasma gondii* em felinos. Durante o estudo foram utilizados vinte e cinco (25) gatos sem raça definida, divididos em cinco grupos contendo cinco animais cada. Os grupos G1 e G3 receberam proteínas de roptrias (200µg) mais Quil-A (20µg) pela via nasal e retal, respectivamente. Os grupos G2 e G4 receberam soro albumina bovina (200µg) mais Quil-A (20µg) pelas via nasal e retal, e o grupo G5 permaneceu como grupo controle. As doses vacinais foram realizadas nos dias 0, 21, 42, e 63. O desafio foi realizado com 800 cistos da cepa ME-49 no dia 70 (dia do desafio). Dois animais do G1 e três do G3 apresentaram níveis de anticorpos IgG acima do ponto de corte, quanto aos anticorpos da classe IgM no dia do desafio dois animais do G1 apresentaram níveis acima do ponto de corte e nenhum do G3. A resposta imune humoral não foi correlacionada com os felinos que eliminaram menor quantidade de oocistos nas fezes. A eliminação de oocistos foi 98,4%; 87,5%; 53%, e 58% menor do que o grupo controle (G5), respectivamente nos grupos G1, G2, G3, e G4. A vacina de roptrias nasal e retal apresentaram proteção parcial em felinos quando desafiados com cistos do *T. gondii*, entretanto, a via nasal foi mais eficaz em conferir imunidade nos animais do estudo que a via retal.

Palavras chave: Hospedeiro definitivo. Proteínas de roptrias. Toxoplasmose. Vacina.

ZULPO, Dauton Luiz. **Protection Against Oocyst Shedding in Cats Immunized with Crude Rhopty Proteins from *Toxoplasma gondii***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

2.2 ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate an intranasal and rectal vaccine with crude rhopty proteins from *Toxoplasma gondii* in cats. In thi study twenty five shorthair cats were used, they were divided in five groups G1-G5 with five animals in each. The groups G1 and G3 received 200µg of rhopty proteins plus Quil-A (20µg)

by nasal and rectal route, respectively. Animals from G2 and G4 received 200µg of bovine serum albumin plus Quil-A (20µg) through the same routes and G5 remained as negative control. The treatments were performed on days 0, 21, 42, and 63. The challenge was performed on day 70 with 800 cysts of ME-49 strain. Two cats from G1 and three from G3 showed IgG antibodies above cut off at challenge day, as the IgM antibodies two cats of G1 showed antibodies above cut off and no cat in group G3. There were no correlations between oocyst shedding and antibodies levels, once that the animals with antibody titers showed no differences in oocyst shedding. The oocyst shedding were 98.4% (G1), 87.5% (G2), 53.0% (G3), e 58% (G4) lower than G5, respectively. Vaccine for rhoptry nasal and rectal showed partial protection in cats when challenged with *T. gondii* cysts, however, the nasal route was more effective to conferring immunity in the animals the study that rectal route.

Key words: Definitive host. Rhoptry proteins. Toxoplasmosis. Vaccine.

2.3 INTRODUÇÃO

Os felídeos são considerados os únicos hospedeiros definitivos do parasita (FRENKEL et al., 1970; HUTCHISON et al., 1971). Após infectados estes animais podem eliminar milhões de oocistos pelas fezes, contaminando o solo e água, que contaminam várias espécies animais inclusive o homem (FRENKEL & SMITH, 1982). O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que normalmente causa uma infecção subclínica. Porém, a infecção primária durante a gestação pode causar patologias fetais bem como abortamento em alguns animais e em humanos (VERCAMENN et al., 2000).

Um dos maiores surtos de toxoplasmose ocorreu no Brasil, em Santa Isabel do Ivaí-PR, onde, aparentemente, uma única gata com seus filhotes contaminou o manancial de água da cidade, o que levou a infecção de mais de 500 pessoas com todas as consequências da doença, ou seja, formas congênita e ocular (NAVARRO, 2002; DUBEY et al., 2004).

O *T. gondii* possui um complexo apical composto de estruturas e organelas (roptrias, grânulos densos e micronemas) importantes para a invasão celular, replicação do parasita e sobrevivência dentro da célula (GARCIA et al., 2004). Algumas proteínas destas organelas foram descritas como candidatas a compor uma vacina, dentre elas, podemos destacar a ROP2, GRA5, e a GRA7 (IGARASHI et al., 2008). Vacinas de subunidade do *T. gondii* devem utilizar antígenos que estimulem a imunidade celular, bem como, induzir uma imunidade de mucosa que seja suficiente para impedir a adesão e a entrada do parasita nas células do intestino (BUXTON et al., 1989; GARCIA et al., 2004; GARCIA, 2009).

Estudos para diminuir a eliminação de oocistos, em gatos, com a cepa mutante T-263 (FRENKEL et al., 1991), taquizoitos irradiados com ^{60}Co (OMATA et al., 1996), bem como, roptrias do parasita (GARCIA et al., 2007), todos estes verificaram uma proteção parcial na eliminação de oocistos. No entanto, Freyre et al. (1993) utilizando a cepa T-263 verificaram 100% de proteção contra a eliminação de oocistos em gatos após desafio com cepa heteróloga.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a proteção contra a eliminação de oocistos em gatos imunizados pela via nasal e retal com proteínas de roptrias do *T. gondii*.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) sob o nº 51/07.

2.4.1 Amostras do *Toxoplasma gondii*

Foram utilizadas as amostras RH e ME-49 do *T. gondii*. A cepa RH, isolada por Sabin (1941) de uma criança com encefalite, é uma cepa não cistogênica do Tipo I, utilizada para obtenção de taquizoitos para posterior isolamento das proteínas de roptrias do parasita para a imunização dos felinos e para realizar a Prova Imunoenzimática Indireta (ELISA). A cepa ME-49 isolada por Lunde & Jacobs (1983) é uma amostra cistogênica do Tipo II utilizada para obtenção de cistos teciduais para posterior desafio experimental dos felinos. Camundongos albinos fêmeas suíças Webster, entre 45 a 60 dias, foram utilizados para replicar a cepa RH e ME-49 pela via intraperitoneal e oral, respectivamente, para obtenção de taquizoitos e bradizoitos.

2.4.2 Obtenção de Proteínas de Roptrias

Para obtenção das roptrias, 40 camundongos foram inoculados pela via intraperitoneal com 10^5 taquizoitos vivos e quarenta e oito horas após o exsudato foi obtido por lavagem da cavidade peritoneal. A obtenção das roptrias dos taquizoitos do *T. gondii* foi efetuado como descrito por Garcia et al. (2004). Após a obtenção dos taquizoitos, o material foi submetido a três lavagens com TES (TES: 250mM sacarose; 1mM EDTA; 5mM trietanolamina-HCl; pH 7,5) e centrifugado. O sedimento foi ressuspendido em TES e rompido aplicando-se uma pressão de 50 Kg cm^3 . As células não rompidas foram sedimentadas por 10 minutos a centrifugação de $750 \times g$, a parte solúvel foi homogeneizada e posteriormente centrifugada a $120.000 \times g$ por uma hora. O sedimento foi homogeneizado em TES, distribuído em tubos de policarbonato, contendo quatro gradientes de sacarose 1.1M, 1.4M, 1.6M, sobre um colchão de 1.8M e centrifugados a $100.000 \times g$ por três horas. A banda contendo as roptrias (1,4M) foi cuidadosamente recolhida e novamente homogeneizada com TES, e centrifugada a $120.000 \times g$. A concentração de proteína das roptrias foi determinada pelo método de ácido biocinínico (BCA Protein Assay Reagente, Pierce), tendo como padrão soro albumina bovina e a leitura realizada em espectrofotômetro.

2.4.3 Obtenção e Quantificação de Cistos de *T. gondii*

Para obtenção de cistos da amostra ME-49, 10 camundongos foram inoculados com 50 cistos da cepa ME-49 pela via oral e após seis semanas de inoculação foi realizada a eutanásia. Os cistos detectados no cérebro foram quantificados e posteriormente utilizados para o desafio experimental.

2.4.4 Vacinação e Desafio dos Felinos

2.4.4.1 Animais

Vinte e cinco felinos entre machos e fêmeas com idade entre três a seis meses, sem raça definida, foram utilizados no ensaio experimental. Estes, foram mantidos em baias individuais, onde receberam ração e água *ad libitum*. Todos os

felinos selecionados foram monitorados previamente e apresentaram duas sorologias negativas na reação de imunofluorescência indireta (CAMARGO, 1973), considerando título <16, e amostras de fezes negativas nas Técnicas de Willis-Mollay e Sheatter para parasitas intestinais.

2.4.4.2 Imunização e Desafio

O esquema de imunização e desafio pode ser observado na Tabela 1. Os gatos foram divididos em cinco grupos, 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3), 4 (G4) e 5 (G5) contendo cinco animais cada. O G1 recebeu proteínas de roptrias (200 µg) que foram diluídas em Quil-A (20µg), o G2 recebeu soro albumina bovino (200 µg) mais Quil-A (20µg) ambos os grupos foram imunizados pela via nasal. O G3 recebeu proteínas de roptrias (200 µg) mais Quil-A (20µg), e o G4 recebeu soro albumina bovina (200 µg) com Quil-A (20µg) ambos pela via retal, e o G5 permaneceu como grupo controle negativo. As imunizações foram realizadas nos dias 0, 21, 42 e 63 do experimento. Os animais de todos os grupos, após sedação (Zoletil® 50, 25mg/Kg), por via intramuscular, foram desafiados com aproximadamente 800 cistos da cepa ME-49 do *T. gondii* por sonda estomacal no dia 70.

Tabela 1 - Imunização e desafio dos felinos.

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5
Via	nasal	nasal	Retal	retal	Controle
Imunização 0, 21, 42 e 63	Roptria 200µg Quil-A 20µg	SAB 200µg Quil-A 20µg	Roptria 200µg Quil-A 20µg	SAB 200µg Quil-A 20µg	Controle
Desafio 70	800 cistos ME-49	800 cistos ME-49	800 cistos ME-49	800 cistos ME-49	800 cistos ME-49

2.4.5 Amostras Biológicas de Sangue e Obtenção de Soro

Amostras de sangue dos cinco grupos foram obtidas nos dias -7, 0, 21, 42, 63, 70, 85, 100, 115, 130 e 160 do experimento, e após obtenção do soro, foram utilizadas para a realização das reações sorológicas.

2.4.6 Amostras Biológicas de Fezes para Dosagem de IgA Intestinal

Amostras de fezes dos grupos G1, G3 e G5 foram coletadas no dia do desafio diretamente da ampola retal com 10mL de solução fisiológica. Posteriormente, foram centrifugadas a 750 x g por 10 minutos e recolhido 1mL do sobrenadante para posterior realização do ELISA para pesquisa de IgA.

2.4.7 Amostras Biológicas de Fezes e Contagem de Oocistos

As fezes foram colhidas duas vezes ao dia, do terceiro até o 20° dia após o desafio, e depois de homogeneizadas foram processadas segundo descrito por Garcia et al. (2007). Para cada grama de fezes foi adicionado 9mL de solução de sacarose (densidade 1208), esta solução foi filtrada em gaze cirúrgica, e centrifugada por 10 minutos à 750 x g. A presença ou ausência de oocistos foi verificada em microscópio óptico, colocando-se 25µl do menisco entre lâmina e lamínula, em duplicata. Quando os oocistos foram detectados no sobrenadante, o conteúdo (9mL) foi recolhido e diluído em 40mL de água destilada, e posteriormente centrifugado a 750 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1ml de salina (salina: 0,85% NaCl). O número de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer.

2.4.8 Ensaio Imunoenzimático Indireto - ELISA

Após a padronização da diluição dos soros e conteúdo intestinal, conjugado e concentração da proteína o ELISA foi realizado como descrito por Garcia et al. (2006). A adsorção das microplacas (placas de Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, a Dinamarca) foi realizada com proteínas de rotrias, o mesmo antígeno utilizado para imunizar os felinos, esta, foi realizada com 100 µL de tampão carbonato (0,1M, pH=9,6) com 5µg/ml de proteínas de rotrias, e posteriormente, incubadas durante a noite em 6°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 (50 mM Tris, pH 7,4, contendo 150 mM de NaCl e Tween 20 0,05%) e os locais não imunes foram bloqueados com tampão carbonato contendo 8% de leite em pó desnatado e incubados por uma hora a 37°C e novamente realizada as lavagens. Os soros controles e testes foram diluídos (1:100 para detectar IgM e IgG

sérica) em PBS-Tween 20 com 5% de leite em pó e adicionado (100 µL) em duplicata, o conteúdo intestinal foi utilizado sem diluir (para detecção de IgA intestinal) e adicionado (100 µL) em duplicata, posteriormente incubados por uma hora à 37°C. Após as lavagens, adicionou-se 100 µL de conjugado anti-felino IgM, IgG e IgA marcado com Peroxidase, diluído (1:10.000 para IgM e IgG e 1:2500 para IgA) em PBS-Tween 20 com 5% de leite em pó e novamente incubadas. Após as lavagens a atividade da peroxidase foi revelada adicionando 100 µL do tampão substrato cromógeno (40mg ortho-phenylenediamina/100ml de 0,1M tampão citrato/fosfato, pH 6,0 e 40µl de H₂O₂) e a reação interrompida com 50 µL de ácido clorídrico (1N de HCl). A densidade ótica (DO) foi lida em 490 nanômetros em leitor de microplacas de ELISA. O ponto de corte foi calculado pela DO média dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão do controle negativo.

2.4.9 Proliferação de Linfócitos

Amostras de sangue com heparina dos animais do G1 e G3 foram obtidas no dia do desafio. O sangue foi centrifugado para separação dos linfócitos em Meio de Separação de Linfócitos (LSM). Após a separação, foram realizadas três lavagens em meio RPMI 1640. As células foram homogeneizadas em meio RPMI 1640 suplementado (5% de soro fetal bovino, 25 mM de hepes, 1mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 50µM de β-mercaptoetanol e 1mM de penicilina-estreptomicina). As células foram diluídas a 5×10^5 linfócitos/ml e repicadas, em triplicata, em um volume de 200µl por cavidade em placa para cultura de células. Para avaliar o estímulo e a proliferação dos linfócitos 5, 10 e 15µg de proteínas de roptrias/ml foi adicionado ao meio de cultivo. Como controle positivo da proliferação utilizou-se 10µg de concanavalina-A/ml e um controle negativo sem estimulação foi utilizado. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por quatro dias. A proliferação celular foi determinada pelo kit Vybrant MTT Cell Proliferation Assay[®], seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com absorvância de 540 nanômetros e proliferação foi expressa em número total de células.

2.4.10 Análise Estatística

A análise estatística para a comparação da eliminação de oocistos entre os grupos foi realizada pelo teste Mann–Whitney, com os dados transformados em logaritmos. As diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Produção e Purificação das Roptrias

As roptrias do *T. gondii*, após o fracionamento sub-celular, foram observadas na fração 3 (1.4M e uma densidade de 1.17 g/cm^3) e após a eletroforese em SDS-PAGE, demonstrou proteínas com massa molecular de aproximadamente 20, 29, 55 KDa e outra entre 70 e 100 KDa.

2.5.2 Avaliação da Resposta Imune Intestinal induzida pela Imunização com as Proteínas de Roptrias através do ELISA

A resposta de IgA do conteúdo intestinal, pode ser observada na Fig 1. No G1, todos os felinos apresentaram IgA intestinal acima do ponto de corte (DO médio=0,132) no dia do desafio. No G3 somente um animal apresentou resposta imune de IgA. O G5, controle negativo, não apresentou resposta imune em níveis detectáveis.

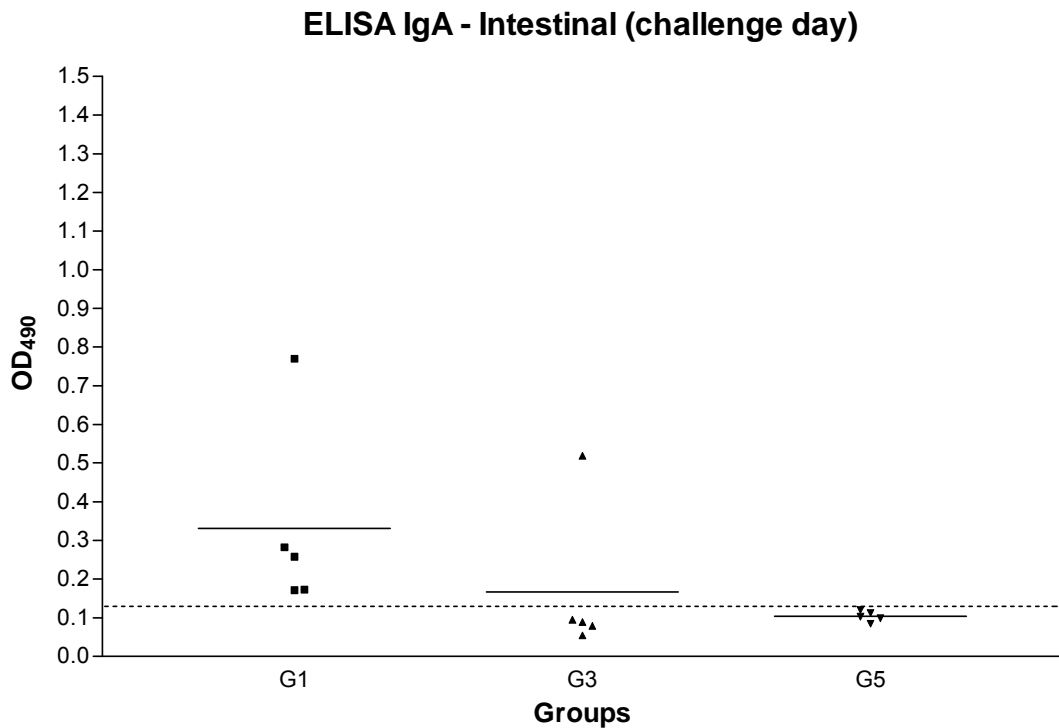


Figura 1 - Determinação da resposta de anticorpos IgA do conteúdo intestinal dos felinos através do ELISA. A figura mostra os resultados dos grupos G1, G3 e G5 no dia do desafio. O G1 recebeu roptrias mais Quil-A pela via nasal. O G3 recebeu roptrias mais Quil-A pela via retal. O G5 permaneceu como grupo controle. Os grupos receberam um desafio de 800 cistos da cepa ME-49. A linha tracejada indica o ponto de corte.

2.5.3 Avaliação da Resposta Imune Humoral Induzida pela Imunização com as Proteínas de Roptrias através do ELISA

A cinética da resposta de IgM e IgG dos soros, podem ser observadas nas Fig. 2 e 3. Dois animais do G1 apresentaram níveis de IgM (DO médio= 0,200) acima do ponto de corte no dia do desafio, no entanto, os animais do G3 apresentaram IgM (DO médio= 0,180) acima do ponto de corte somente após o desafio, os demais grupos controles (G2, G4 e G5) não apresentaram IgM acima do ponto até o dia do desafio. Com relação a resposta de IgG a vacinação estimulou uma resposta de anticorpos em dois animais do G1(DO médio=0,200) e três animais do G3 (DO médio=0,200) no dia do desafio. Todos os animais dos cinco grupos soroconverteram (IgM e IgG) após o desafio experimental.

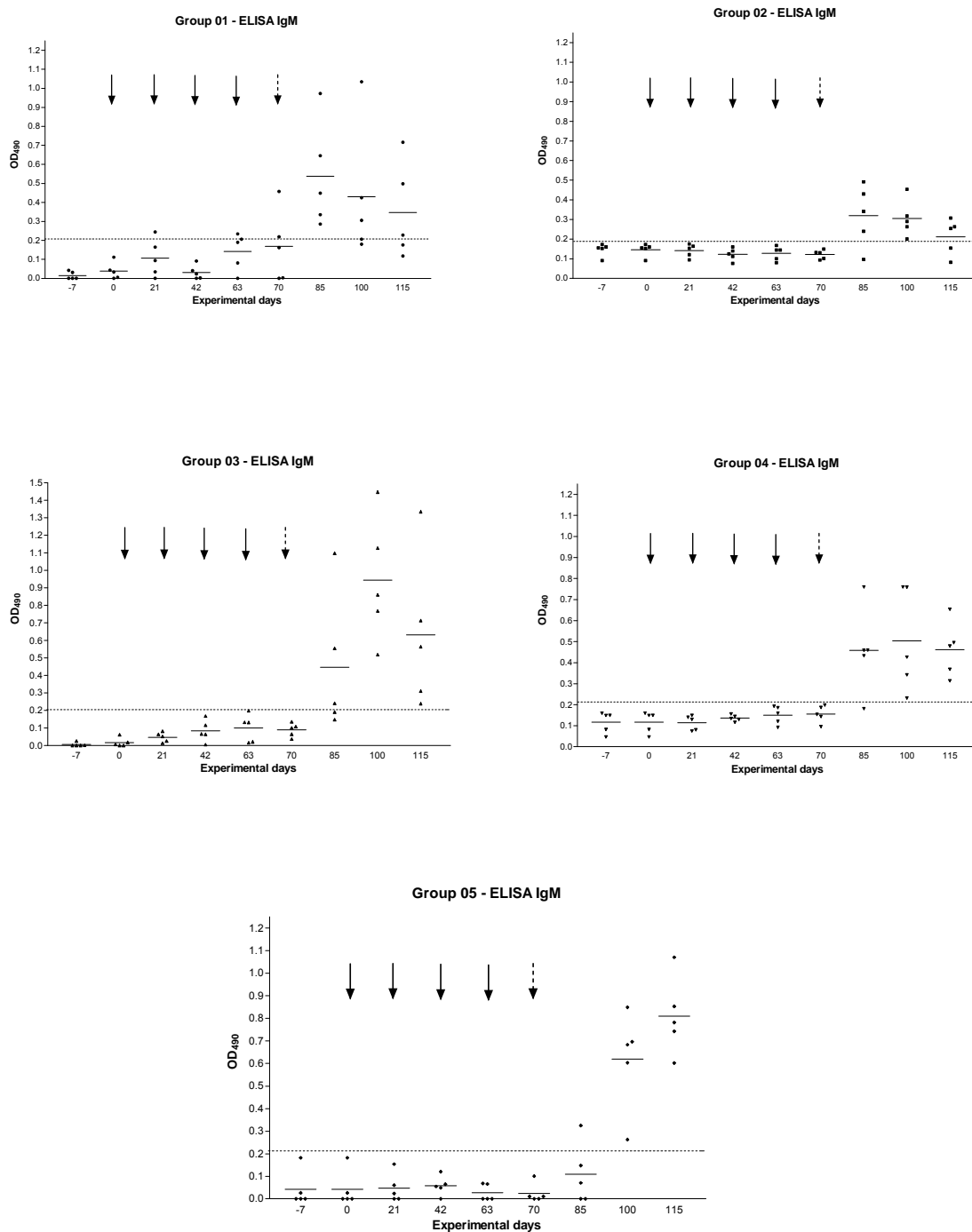


Figura 2 - Determinação da resposta de anticorpos IgM do soro dos felinos através do ELISA. A figura mostra os resultados dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, cada grupo com cinco animais. O G1 recebeu roptrias mais Quil-A, o G2 recebeu Soro albumina bovina (SAB) mais Quil-A, ambos pela via nasal. O G3 recebeu roptrias mais Quil-A, o G4 recebeu SAB mais Quil-A, ambos pela via retal. O G5 permaneceu como grupo controle. As imunizações foram realizadas nos dias 0, 21, 42 e 63 (setas pretas). Todos os grupos receberam um desafio de 800 cistos da cepa ME-49 no dia 70 (seta tracejada). A linha tracejada indica o ponto de corte.

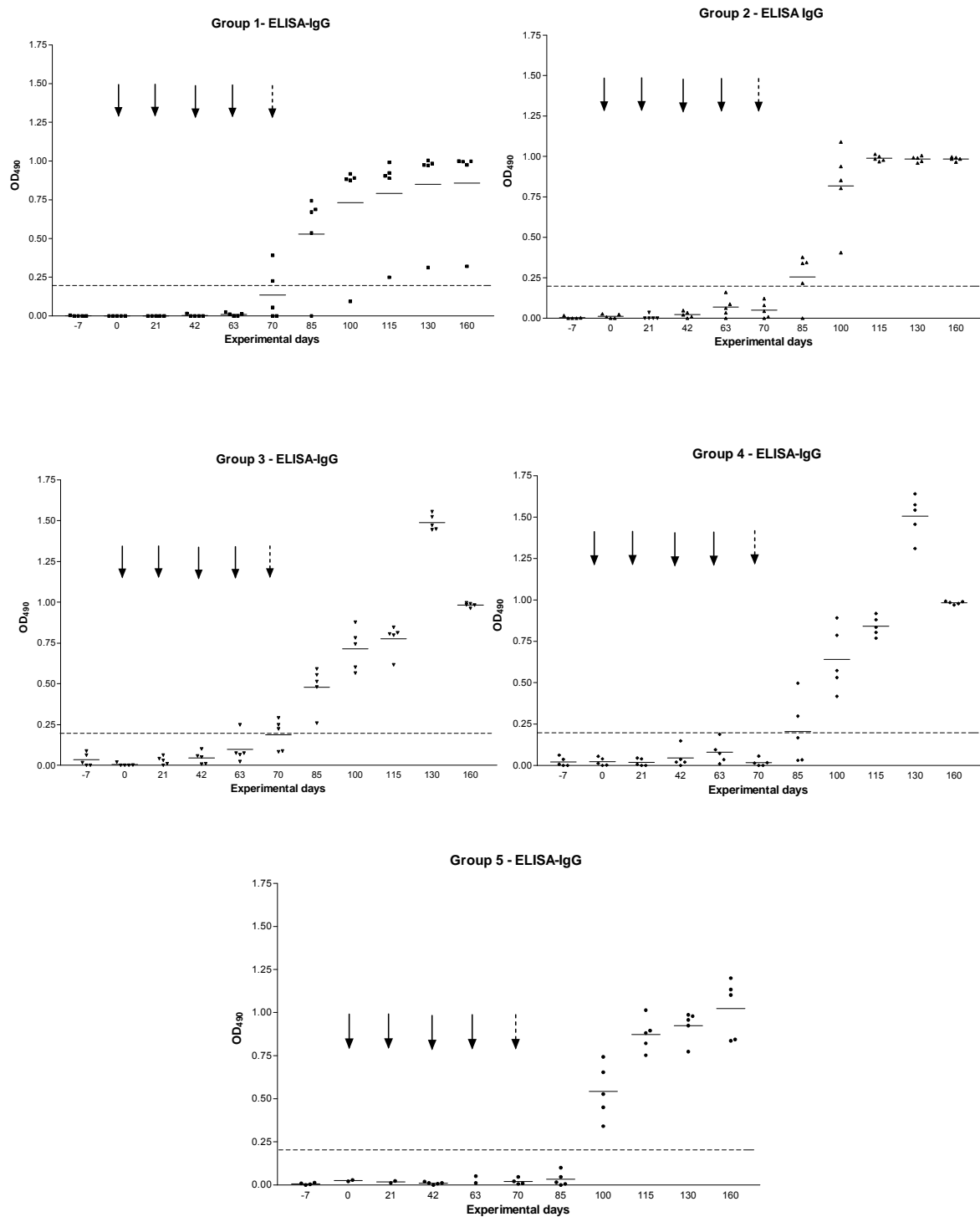


Figura 3 - Determinação da resposta de anticorpos IgG do soro dos felinos através do ELISA. A figura mostra os resultados dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, cada grupo com cinco animais. O G1 recebeu roptrias mais Quil-A, o G2 recebeu Soro albumina bovina (SAB) mais Quil-A, ambos pela via nasal. O G3 recebeu roptrias mais Quil-A, o G4 recebeu SAB mais Quil-A, ambos pela via retal. O G5 permaneceu como grupo controle. As imunizações foram realizadas nos dias 0, 21, 42 e 63 (setas pretas). Todos os grupos receberam um desafio de 800 cistos da cepa ME-49 no dia 70 (seta tracejada). A linha tracejada indica o ponto de corte.

2.5.4 Avaliação da Resposta Imune Celular Induzida pela Imunização com as Proteínas de Roptrias

Verificou-se uma maior proliferação celular no G1 quando as células foram estimuladas com 5 μ g de roptrias. A proliferação celular dos animais do G1 pode ser observado na Fig. 4. O G3 não apresentou proliferação de linfócitos com índice de estimulação ≥ 2 .

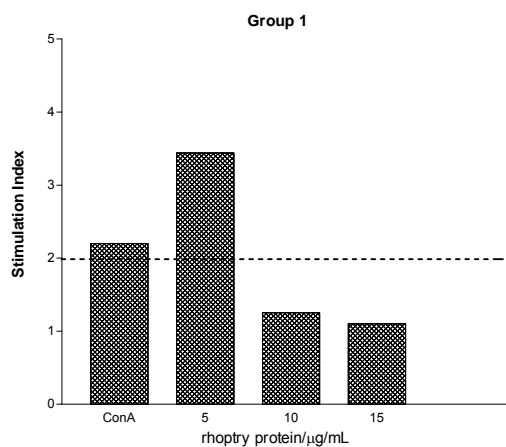


Figura 4 - Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico estimulados com antígenos do *T. gondii*, obtidos de animais imunizados com quatro doses pela via nasal. A estimulação dos linfócitos foi realizada utilizando 5, 10 e 15 μ g de roptrias e o controle positivo estimulado com Concanavalina-A 10 μ g. A linha tracejada indica o ponto de corte.

2.5.4 Eliminação de Oocistos

A eliminação média de oocistos dos felinos, por grupo, esta representada na Fig. 5. O início da eliminação de oocistos ou período pré patente (PPP) ocorreu em média 6,8 dias após o desafio (DPD) no grupo G1; 4,8 dias no G2; 4 dias no G3; 4,4 dias no G4 e 4,8 dias no G5. O pico da eliminação de oocistos ocorreu no 4 $^{\circ}$, 5 $^{\circ}$, 11 $^{\circ}$, 5 $^{\circ}$, e 6 $^{\circ}$ DPD nos grupos G1, G2, G3, G4, e G5, respectivamente. O período patente (PP) médio foi de 2,8 dias; 6 dias; 9,6 dias; 8,2 dias e 8,8 dias nos grupos G1, G2, G3, G4, e G5, respectivamente. Comparativamente a eliminação total de oocistos dos grupos durante o período patente (PP) foi 98,4% (G1); 87,5% (G2); 53% (G3) e 58% (G4) menor que o G5, grupo controle. A análise estatística demonstrou que o G1 eliminou

significativamente menos oocistos por grama de fezes que os grupos G2, G3, G4 e G5 ($P < 0,05$). O número de oocistos eliminados nas fezes durante o PP pelo grupo G1 foi 91.000 oocistos/g/fezes, e 732.500, 2.743.000, 2.450.500 e 5.845.000 respectivamente para os grupos G2, G3, G4 e G5. Todos os animais dos cinco grupos em algum período eliminaram oocistos.

Tabela 2 - Eliminação média de oocistos em felinos. O G1 recebeu roptrias mais Quil-A, o G2 recebeu Soro albumina bovina (SAB) mais Quil-A, ambos pela via nasal. O G3 recebeu roptrias mais Quil-A, o G4 recebeu SAB mais Quil-A, ambos pela via retal. O G5 permaneceu como grupo controle. As imunizações foram realizadas nos dias 0, 21, 42 e 63. Todos os grupos receberam um desafio de 800 cistos da cepa ME-49 no dia 70.

Grupos	PPP (dias)	Pico (dias)	PP (dias)	Total de oocistos	Eficácia (%)
G1	6,8	4	2,8	91.000	98,4
G2	4,8	5	6	732.500	87,5
G3	4	11	9,6	2.743.000	53
G4	4,4	5	8,2	2.450.500	58
G5	4,8	6	8,8	5.845.000	

PPP: Período pré-patente; Pico: Pico de eliminação de oocistos nas fezes; PP: Período Patente; Total de oocistos: Total de oocistos eliminado durante o PP pelo respectivo grupo.

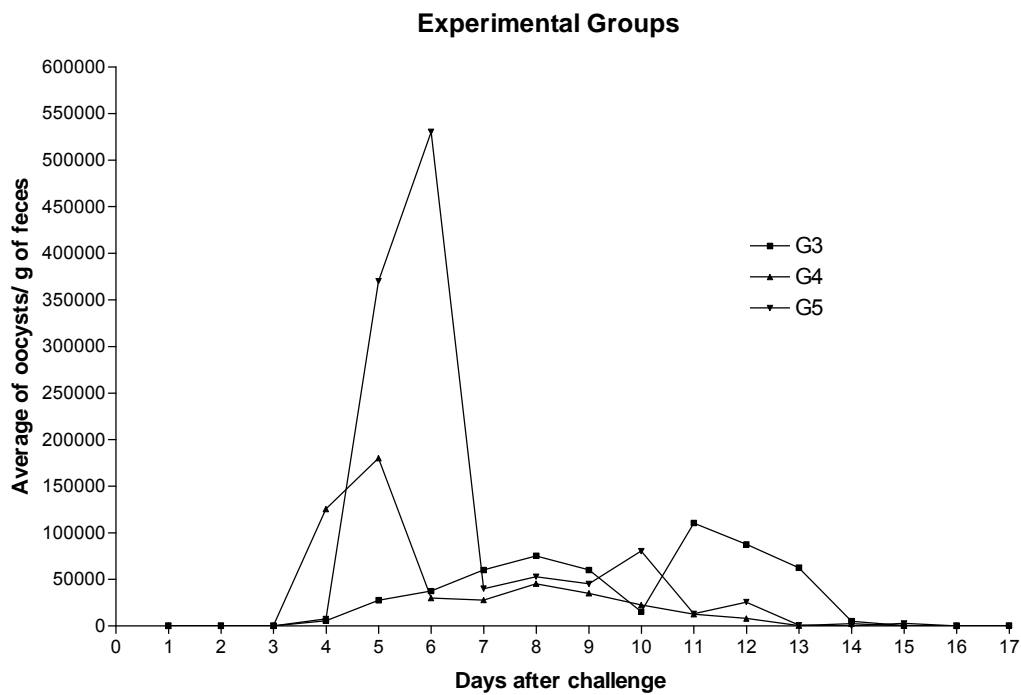
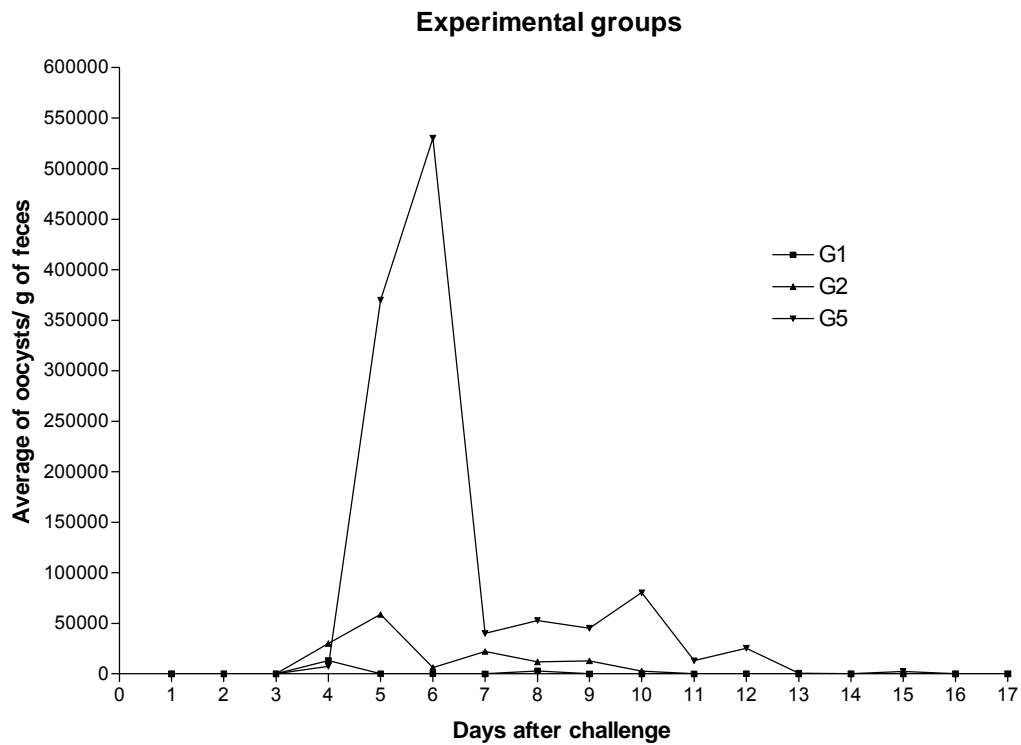


Figura 5 - Eliminação de oocistos em felinos desafiados com cistos de *T. gondii*. A figura mostra os resultados dos grupos G1, G2 e G5 e G3, G4 e G5, cada grupo com cinco animais. O G1 recebeu roptrias mais Quil-A, o G2 recebeu Soro albumina bovina (SAB) mais Quil-A, ambos pela via nasal. O G3 recebeu roptrias mais Quil-A, o G4 recebeu SAB mais Quil-A, ambos pela via retal e o G5 permaneceu como controle. Todos os grupos receberam um desafio de 800 cistos da cepa ME-49. O G5 é o mesmo grupo nos dois gráficos.

2.6 DISCUSSÃO

Embora os felinos sejam considerados fundamentais na transmissão do *T. gondii* existem poucos trabalhos que utilizaram vacinas para prevenir a eliminação de oocistos. Segundo Garcia et al. (2007) a produção de uma vacina com este objetivo seria importante tanto para o controle da toxoplasmose humana, como também para os animais de produção, uma vez que diminuiria a contaminação ambiental.

No presente estudo, os felinos do G1 tiveram uma redução na eliminação de oocistos de 98,4% quando comparados com o grupo controle (G5) e uma eficácia de 87,6% quando comparados com o grupo controle da via nasal (G2). Em estudos, utilizando a cepa mutante T-263 viva, os autores verificaram uma redução na eliminação de oocistos de 84 a 100% (FRENKEL et al., 1991; FREYRE et al., 1993). Outro estudo utilizando a mesma cepa, T-263 com objetivo de determinar a eficácia da vacina em felinos de propriedades rurais e diminuir a exposição de suínos a toxoplasmose, verificaram uma diminuição na prevalência do *T. gondii* em suínos e em felinos jovens (MATEUS-PINILLA et al., 1999). Estes autores demonstram a importância da imunização de felinos na prevenção da doença. No entanto, os estudos com esta cepa T-263 foram descontinuados, provavelmente pelos problemas de conservação dos bradizoitos vivos a baixas temperaturas, além do risco de infecção para seres humanos e animais (DUBEY, 1995).

Omata et al. (1996) testaram uma vacina para felinos com taquizoitos da cepa Beverley irradiados com ^{60}Co e verificaram uma proteção parcial na eliminação de oocistos de 43%, quando os felinos foram desafiados com cistos cerebrais da mesma cepa. No entanto, quando outro grupo de felinos foi vacinado com taquizoitos irradiados da cepa RH e desafiados com a cepa Beverley todos eliminaram oocistos nas fezes. Com o mesmo objetivo, porém, utilizando uma vacina de DNA expressando a proteína ROP2, Mishima et al. (2002) não verificaram redução na eliminação de oocistos, no entanto, os felinos imunizados produziram IgG sérica para a ROP2.

Da mesma forma, Garcia et al. (2007) testaram uma vacina em gatos com antígenos de roptrias pela via nasal e verificaram que 68% dos felinos não tinham oocistos detectáveis nas fezes após o desafio com a cepa VEG (tipo III).

Estes resultados deram base para o desenvolvimento do presente estudo, ou seja, um aumento no número de felinos por grupo experimental, uso de uma cepa diferente para o desafio (ME-49, tipo II), bem como testar a via retal como uma opção na imunização.

No presente trabalho nenhum animal apresentou sinais clínicos após o desafio experimental com 800 cistos teciduais da cepa ME-49. Sinais clínicos, em felinos desafiados experimentalmente com cistos teciduais, são geralmente raros (DUBEY & THULLIEZ, 1989; BURNEY et al., 1995), entretanto diarreia pode ser observada (LAPPIN et al., 1989; DUBEY et al., 1995). Os sinais clínicos da toxoplasmose em gatos dependem de vários fatores, tais como, idade, época da primo infecção, tipo da cepa, estágio do parasita, forma como o animal se infecta, estado nutricional e infecções simultâneas (DUBEY, 1995).

Conforme descrito anteriormente, a proteção contra a eliminação de oocistos em felinos é difícil de conseguir e esta só será obtida, seja totalmente ou parcialmente, após o estímulo adequado da imunidade do hospedeiro. Desta forma as vias nasal e retal têm sido descritas como bons estimulantes da imunidade humoral e celular (FINERTY et al., 2000). Além disso, a via nasal requer menor quantidade de antígeno do que a via oral e estimula tanto a imunidade local quanto sistêmica (VELGE-ROUSSEL et al., 2000). Alguns estudos em camundongos com vacina de SAG1 pela via nasal descreveram uma proteção parcial contra a formação de cistos teciduais do *T. gondii* (DEBARD et al., 1996; VELGE-ROUSSEL et al., 2000; BONENFANT et al., 2001).

A vacinação tanto pela via nasal (G1), como pela via retal (G3) estimulou parcialmente a produção sérica de IgM e IgG . Alguns estudos têm revelado que a presença de IgA intestinal é um fator importante no controle da toxoplasmose (OMATA et al., 1997; BONENFANT et al., 2001). Desta forma, considerando que todos os animais do G1 apresentaram IgA intestinal em níveis acima do ponto de corte, o que pode ter inibido a adesão dos bradizoitos nas células intestinais, e conseqüentemente, uma menor eliminação de oocistos e período patente, demonstrando assim a eficácia da imunização e da via utilizada. Igarashi et al. (2008) testando uma vacina de proteínas recombinantes em camundongos observaram níveis significativos de Imunoglobulina-A nas fezes desses animais no dia que foi realizado o desafio, estes resultados estão em conformidade com nosso trabalho, enfatizando a importância da imunidade local para o *T. gondii*.

Finerty et al. (2000) como alternativa de estimular a imunidade de mucosa, pela proliferação de linfócitos, administraram adjuvantes Quil-A ou Toxina Colérica pela via retal em felinos e observaram a estimulação de Células T. Entretanto, no presente trabalho houve uma resposta celular sistêmica pela proliferação de linfócitos nos felinos imunizados pela via nasal, diferentemente ao grupo imunizado pela via retal que não apresentou estimulação, o que demonstrou a efetividade da imunização nasal. Este tipo de resposta já havia sido observada, no entanto, em camundongos imunizados com SAG 1 e toxina colérica (DEBARD, et al., 1996).

Os resultados observados vão ao encontro daqueles descritos por Frenkel et al. (1991), onde verificaram que não é preciso os felinos eliminarem oocistos durante as imunizações para obter uma imunidade eficaz contra um posterior desafio experimental. Garcia et al. (2005) testando uma vacina de roptrias do *T. gondii* em suínos, observaram uma proteção contra a infecção aguda e uma proteção parcial contra a formação de cistos teciduais. Estes resultados, segundo os autores, poderiam estar associados à baixa imunidade intestinal induzida pela vacinação sistêmica. Além disso, mesmo após a imunização subcutânea com taquizoítos e produção de anticorpos sistêmicos, alguns felinos não adquirem imunidade contra a eliminação de oocistos (DUBEY & FRENKEL, 1972; FRENKEL et al., 1991). Adicionalmente, Frenkel & Smith (1982) descreveram que alguns gatos não desenvolveram anticorpos após a eliminação de oocistos nas fezes.

O período pré patente observado neste estudo foi de 4 a 9 dias, com um pico de eliminação no 5º dia após desafio. Este resultado foi semelhante ao descrito por Dubey (2005), ou seja, um período pré patente variando de 3 a 10 dias em felinos infectados com cistos teciduais. Segundo Dubey (2005), a infecção nos felinos é mais comum pela ingestão de bradizoítos e a eliminação de oocistos é em torno de 100%, sendo assim, utilizamos no desafio experimental cistos teciduais.

Neste estudo foi verificada eficácia de 98,4% na proteção contra a eliminação de oocistos do *T. gondii* no G1, comparando com o G5. Porém quando o G1 foi comparado com o grupo G2, essa eficácia foi de 87,6%, isso ressalta a menor eliminação de oocistos no G1, que eliminou apenas 91.000 oocistos. A análise estatística demonstrou que o G1 eliminou significativamente ($P < 0,05$) menos oocistos que todos os outros grupos. Nos felinos do G3, vacinados pela via retal, observou-se uma eficácia de 53%. Desta forma, a vacinação com roptrias pela via

nasal mostrou uma proteção parcial em felinos, porém, outros estudos devem ser conduzidos para incrementar novas perspectivas em relação a vacinas contra toxoplasmose em felinos.

2.7 REFERÊNCIAS

- 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** volume 69, páginas 1605-1612, ano 2001.
- 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.
- BUXTON, D.; UGGLA, U.; LOVGREN, B. K.; THOMSON, K. M.; LUNDEN, A.; MOREIN, B.; BLEWETT, D. A. Trial of a novel experimental *Toxoplasma* iscom vaccine in pregnant sheep. **British Veterinary Journal** 145, 451-457, 1989.
- CAMARGO, M. E. Introdução as técnicas de Imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica** 10, 143-171, 1973.
- DEBARD, N. D.; 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. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. **Veterinary Parasitology** 133, 289–298, 2005.
- DUBEY, J. P. & FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology** 19, 155–177, 1972.
- DUBEY, J. P. & THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal American Veterinary Medical Association** 194, 1297–1299, 1989.
- DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology** 81, 887–893, 1995.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology** 90, 721-726, 2004.

FINERTY, S.; STOKES, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HILLMAN, T. J.; REEVES, N.A.; WHITING, C.V.; SCHAAPER, W. M. M.; DALSGAARD, K.; HARBOUR, D. A. Mucosal immunization with experimental feline immunodeficiency virus (FIV) vaccines induces both antibody and T cell responses but does not protect against rectal FIV challenge. **Vaccine** 18, 3254-3265, 2000.

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. & SMITH, D. D. Immunization of cats against shedding of *Toxoplasma* oocysts. **Journal of Parasitology** 38, 744-748, 1982.

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. 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.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T.; MACHADO, R. Z.; SINHORINI, I. L.; FREIRE, R. L.; MARANA, E. R. M.; TSUTSUI, V.; CONTENTE, A. P. A.; 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.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; LUZ PEREIRA, A. B.; SINHORINI, I. L. *Toxoplasma gondii*: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology** 113, 100-105, 2006.

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.

HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; WORK, K.; SIIM, J. C. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 65, 380-399, 1971.

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.

LAPPIN, M. R.; GREENE, E. G.; PRESTWOOD, A. K.; DAWE, D. L.; TARLETON, R. L. 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.

LUNDE, M. N. & JACOBS L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology** 69, 806-808, 1983.

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.

NAVARRO, I. T. Toxoplasmose: Surto em Santa Isabel do Ivai - Paraná. **O pulo do Gato** 8, 10-13, 2002.

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.

OMATA, Y.; TERADA, K.; TAKA, A.; ISAMIDA, T.; KANDA, M.; SAITO, A. Positive evidence that anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody exist in the intestinal tract of infected cats and exerts protective activity against the infection. **Veterinary Parasitology** 73, 1–11, 1997.

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

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.

VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; HUYGEN, K.; DE BRAEKELEER, J.; DIET, R.; JACOBS, D.; SAMAN, E.; VERSCHUEREN, H. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity** 68, 38-45, 2000.

3 CONCLUSÃO

As proteínas de roptrias foram expressas em alta concentração na densidade de 1,4 molar de sacarose.

Os animais que receberam proteínas de roptrias pela via nasal eliminaram 98,4% menos oocistos que o grupo controle.

As proteínas de roptrias do *T. gondii* estimularam parcialmente a produção da imunidade humoral e celular nos felinos imunizados pela via intranasal.

Todos os animais que foram desafiados com a cepa ME-49 eliminaram oocistos através das fezes e não desenvolveram a doença clinicamente.