



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BEATRIZ DE SOUZA LIMA NINO

**PROTEÇÃO CONTRA A TRANSMISSÃO CONGÊNITA E  
TAXA DE SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS  
BALB/C INFECTADOS  
COM A CEPA RH**

BEATRIZ DE SOUZA LIMA NINO

**PROTEÇÃO CONTRA A TRANSMISSÃO CONGÊNITA E  
TAXA DE SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS  
BALB/C INFECTADOS  
COM A CEPA RH**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina  
2015

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

N716p Nino, Beatriz de Souza Lima.

Proteção contra a transmissão congênita e taxa de sobrevivência em camundongos Balb/c infectados com a cepa RH / Beatriz de Souza Lima

Nino. – Londrina, 2015.

48 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, 2015. Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose – Teses. 2. Doenças congênitas – Teses. 3. Vacinas – Teses. 4. Resposta imune – Teses. 5. Camundongo 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

BEATRIZ DE SOUZA LIMA NINO

**PROTEÇÃO CONTRA A TRANSMISSÃO CONGÊNITA E TAXA  
DE SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS BALB/C  
INFECTADOS  
COM A CEPA RH**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof Dr. Itamar Teodorico Navarro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof Dr. Dauton Luiz Zulpo  
Pontifícia Universidade Católica do  
Paraná - PUC

Londrina, 26 de Fevereiro de 2015.

À minha família por sempre apoiar e incentivar a realização deste trabalho em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por todos os desafios que tive que passar, e conseguir superá-los sempre com toda força e paciência durante todos os momentos de tristeza e felicidade por toda vida.

Agradeço a meus pais Rose e Luiz por todo incentivo e apoio durante todos os momentos, e por me ajudar muito com meus filhos durante os períodos de estudos e reflexões para a realização deste trabalho.

Agradeço a meu marido Evandro por sempre me apoiar, incentivar, sofrer junto e permanecer calmo e nunca me abandonar durante todos os momentos de desespero e desafios que foram superados e que ainda virão pela frente.

Aos meus meninos Mateus e Murilo por me mostrarem que na vida trabalhar e estudar é preciso, mas permanecer os momentos junto com a família são os mais preciosos e sagrados presentes que Deus pode nos dar.

Agradeço a minha avó Dagmar (*in memoriam*) por sempre ser grande incentivadora de todos os planos e projetos da minha vida, estando sempre ao meu lado vibrando com todas as conquistas.

Agradeço a minha Tia Beth por me mostrar que em momentos que queremos desistir de tudo, é quando devemos enfrentar os medos e problemas e seguir em frente.

Agradeço as minhas tias Leyla e Denise que também estiveram presentes e foram muito importantes nos momentos complicados que antecederam a iniciação deste mestrado.

Agradeço a todos os demais membros da minha família por compartilhar os momentos juntos que sempre foram muito importantes.

A minha grande amiga Andréia Carla Eugênio Pupim, que me acompanha desde a graduação por todo incentivo, parceria, companhia, conversas, ajuda e por estar presente sempre em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Luis por toda amizade e por sempre acreditar em meu potencial e aceitar fazer parte do meu desenvolvimento acadêmico e profissional dentro da universidade.

Agradeço também ao Prof. Dr. Itamar e Prof. Dra. Roberta por toda amizade e incentivo no desenvolvimento deste trabalho apoiando sempre a minha

qualificação e aperfeiçoamento profissional.

Agradeço a Profa. Dra. Prof Dra. Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori, por aceitar fazer parte da banca de qualificação, que foi de grande contribuição para a correção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dauton Luiz Zulpo que prontamente atendeu ao convite para participar da banca de defesa.

Agradeço aos colegas da turma de mestrado, por compartilharmos os momentos estressantes de prazos e disciplinas, que foram de grande valor para o desenvolvimento de todo este trabalho.

Agradeço aos amigos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por compartilhar os momentos de descontração necessários para motivar a caminhada a cada dia. Em especial a Elizabete e Aldair por estarem mais próximos compartilhando chefes, laboratórios, estresses e conquistas.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e residentes dos Laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública, Protozoologia, Parasitologia, que permanecem e que passaram por aqui pois sempre tive algo a aprender com cada um.

Por todos aqueles que se tornaram grandes amigos com quem compartilho alegrias, tristezas, conquistas e não somente protocolos e papers.

Agradecer a todos aqueles que contribuíram efetivamente na realização deste trabalho, e também agradeço aqueles que ao menos não colocaram mais pedras no caminho desta dissertação.

Obrigada por tudo!!!

*"Dificuldades preparam pessoas comuns para  
destinos extraordinários".  
C.S Lewis*

*"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória  
é o desejo de vencer".  
Mahatma Gandhi*

NINO, Beatriz de Souza Lima Nino. **Proteção contra a transmissão congênita e taxa de sobrevivência em camundongos Balb/c infectados com a cepa RH.** 2015. 48 pag. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que infecta ampla variedade de animais domésticos e selvagens incluindo seres humanos. É de conhecimento que esse parasita é capaz de ocasionar infecções congênitas em humanos e em animais domésticos, levando a abortos e outras consequência neonatais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral, taxa de sobrevivência, e proteção contra a transmissão congênita em camundongos BALB/c vacinados com proteínas nativas e recombinantes do *T. gondii*. Setenta e cinco animais foram divididos em cinco grupos: grupo 1 (15 µg de rROP2 + 10 µg de QuilA n=15); grupo 2 (15 µg de Proteínas Nativas (roptrias) + 10 µg de QuilA n=15); grupo 3 (15 µg de Fração Total + 10 µg de QuilA n=15); grupo 4 (10 µg de QuilA n=15); grupo 5 (Solução de NaCl 0,9% n=15). Cada grupo recebeu 3 doses de vacina via subcutânea. As doses foram administradas nos dias 0, 21, 42. Sete dias após a última dose, os animais foram colocados para cruzamento na proporção de um macho para três fêmeas. Os camundongos foram desafiados com  $10^3$  taquizoítos da cepa RH por via intraperitoneal no 13º dia da gestação. Animais dos G1, G2 e G3 tiveram nascimentos prematuros. O teste de ELISA demonstrou altos níveis de anticorpos em animais vacinados. Um maior número de animais vacinados sobreviveu após a infecção, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os animais do grupo 1 e do grupo 3 não demonstraram transmissão congênita de *T. gondii*, diferentemente dos grupo G2 (50%), G4 (100%) e G5 (29%).

**Palavras-chave:** Proteínas. Vacina. Toxoplasmose. Imunidade. Infecção Congênita.

NINO, Beatriz de Souza Lima Nino. **Protection against congenital transmission and survival rate in BALB/c mice infected with the RH strain.** 2015. 48 pag. Dissertation (Masters in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan which infects a wide range of domestic and wild animals including birds and humans. It is known that this parasite is one of the few organisms capable of causing congenital infections in humans and other species of domestic animals, in which may occur abortions and other neonatal damages. The aim of this study was to evaluate the humoral immune response, surviving rate and protection against congenital transmission in BALB/c mice vaccinated with native and recombinant proteins of *T. gondii*. Seventy five animals were divided into five groups: group 1 (G1, 15 µg of rROP2 + 10 µg of QuilA n=15); group 2 (G2, 15 µg of Fraction 3 (roptries) + 10 µg of QuilA n=15); group 4 (G4, 10 µg of QuilA n=15); group 5 (G5, NaCl 0,9% solution n=15). Three doses of vaccine were administrated subcutaneously for each group. The doses were given on days 0, 21, 42. Seven days after the last dose, the mice were mated at a ratio of one male to three females. The mice were infected with 10<sup>3</sup> tachyzoites of RH strain, by intraperitoneal route on 13 days into gestation. The animals from G1, G2 and G3 had premature births. The ELISA test showed high levels of antibodies in vaccinated animals. Most of vaccinated mice survived after infection, however this was not statistically significant. The mice from group 1 and group 3 did not show signs of congenital infection with *T. gondii*, differently from G2 (50%), G4 (100%) and G5 (29%).

**Keywords:** Proteins. Vaccine. Toxoplasmosis. Immunity. Congenital.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>12</b>
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
2.1.1 Ciclo Biológico	12
2.2 Roptrias e ROP2.....	14
2.3 Toxoplasmose Congênita.....	15
2.4 Resposta Imune.....	17
2.5 Vacinação contra <i>T. gondii</i> .....	18
REFERENCIAS.....	20
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
<b>4 ARTIGO</b>	<b>28</b>
INTRODUÇÃO.....	30
Material e Métodos.....	31
<i>Local de Realização</i>	31
<i>Amostras do Toxoplasma gondii</i>	31
<i>Proteínas Nativas do Toxoplasma gondii</i>	32
<i>Obtenção das Proteínas Recombinantes</i>	32
<i>Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)</i>	34
<i>Delineamento Experimental</i>	35
<i>Extração do DNA e Nested PCR</i>	36
<i>Análise Estatística</i>	36
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO.....	42
REFERENCIAS.....	43
<b>5 CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) é um parasita intracelular obrigatório que infecta todos os animais homeotérmicos, e sua prevalência em humanos no Brasil é uma das maiores do mundo (DUBEY, 2009).

Em hospedeiros imunocomprometidos, tais como pacientes com AIDS e pacientes que receberam transplantes de órgãos, este parasita oportunista pode levar a graves danos e até mesmo letais (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

A toxoplasmose congênita ocorre quando há a transmissão de *T. gondii* para o feto, principalmente durante a fase inicial da gestação quando a mãe se infecta pela primeira vez, ou raramente, como um resultado de uma reativação de uma infecção da mãe durante a fase crônica (WONG e REMINGTON, 1994; MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Além disso, a toxoplasmose congênita possui grande importância clínica. Ela ocorre como infecção aguda durante a gravidez, o que afeta o feto, resultando em coriorretinite, calcificações intracranianas, hidrocefalia retardo mental e até mesmo aborto espontâneo e morte neonatal (PETERSEN, 2007). Essas características da infecção congênita são conhecidas como Tétrade de Sabin (SABIN, 1942).

Aproximadamente dois terços dos pacientes com toxoplasmose congênita são assintomáticos no momento do nascimento, mas podem desenvolver toxoplasmose ocular tardia e apresentar sequelas neurológicas se não forem tratados até um ano de idade (REMINGTON et al. 1961; HILL e DUBEY, 2002).

A imunidade para o *T. gondii* desenvolvida por uma vacina deve associar o local correto de imunização, bem como o uso de proteínas do parasita que promovam proteção adequada, pois o parasita apresenta três estágios diferentes (esporozoíto, taquizoíto e bradizoíto) sendo que estes podem expressar antígenos diferentes em cada um desses estágios (SPEER et al, 1995; GARCIA et al, 2004).

Esse parasita também é um causador da toxoplasmose ocular que apresenta-se como uveíte posterior, esta doença que resulta frequentemente da diminuição e perda da visão. Ocorre também em escala mundial, porém diferenças regionais e diversidade de cepas têm sido associadas com diferentes prevalências ao redor do mundo (MAENZ et al., 2014).

Nos últimos anos vários estudos foram publicados sobre vacinas para a prevenção da transmissão de *T. gondii*, porém, a comparação dos seus resultados é difícil pelos diferentes tipos de imunização, das rotas utilizadas para o desafio (com diferentes estágios de parasita), e cepas de camundongos utilizadas. Vários tipos de abordagem têm sido utilizadas, ou seja, vacinas vivas atenuadas, estirpes *knockout*, vacinas de DNA, que utilizam vetores virais e proteínas recombinantes, e todos descrevem proteção parcial, principalmente contra a mortalidade frente à infecção aguda e presença de cistos nos tecido (GARCIA et al., 2014).

O presente trabalho visa caracterizar a resposta imunológica de camundongos fêmeas da linhagem BALB/c vacinados com proteínas nativas e recombinantes de *T. gondii* frente a uma infecção por cepa RH do *T. gondii*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, espécie pertencente ao Filo Apicomplexa; Levine, 1970, Classe Sporozoasida; Leukart, 1879, Subclasse Coccidiasina; Leukart, 1879, Ordem Eimeriorina; Leger, 1911, Família Toxoplasmatidae, Biocca, 1956 e Gênero *Toxoplasma*; Nicolle and Manceaux, 1909 (DUBEY, 2010). É um parasita intracelular obrigatório (JACOBS; LUNDE, 1957) que tem ampla prevalência em seres humanos e em animais em todo o mundo (DUBEY, 2009).

O *T. gondii* é um parasita, 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 e PETERSEN, 1995). Este coccídio, devido as suas características biológicas, tais como a 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).

Este parasita é um protozoário que normalmente causa uma infecção subclínica, porém a infecção primária durante a gestação pode causar patologias fetais bem como abortos tanto em animais como em humanos (VERCAMMEN et al., 2000). Quando os fetos humanos são infectados podem apresentar hidrocefalia, coriorretinites e retardo mental (JONES et al., 2010).

#### 2.1.1 Biologia do Parasita

O ciclo biológico é do tipo heteroxeno, com uma fase sexuada que ocorre nas células intestinais de felídeos domésticos ou selvagens, membros da Família Felidae, não imunes e outra fase assexuada, extra-intestinal, que ocorre tanto nos hospedeiros intermediários como nos hospedeiros definitivos (FRENKEL, 1971).

A fase sexuada inicia-se com a ingestão de cistos teciduais ou oocistos maduros (MONTROYA & LIESENFELD, 2004) pelos hospedeiros definitivos.

Após a ingestão dos cistos ou dos oocistos, através da ação das enzimas digestivas, são liberados os bradizoítos ou esporozoítos, respectivamente. No epitélio intestinal dos felídeos ocorre a fase de multiplicação por esquizogonia. Após essa multiplicação, por gametogênese são formados os macrogametas (femininos) e microgametas (masculinos) que, após a fecundação, formam os oocistos (DENKERS, 1999). Apesar da infecção dos felídeos poder ocorrer após a ingestão de taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos, no máximo 62% dos animais infectados conseguem completar o ciclo enteroepitelial após a ingestão de taquizoítos ou oocistos comparado à ingestão de bradizoítos (DUBEY, 2005).

Este parasito apresenta três formas evolutivas principais: taquizoíto: forma arqueada, com aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2  $\mu\text{m}$  de largura, encontrado durante a fase aguda da infecção, sendo também denominado forma proliferativa ou forma livre. Possui duas regiões distintas: a) uma extremidade anterior afilada onde está situado o complexo apical, formado por um conjunto de organelas específicas, responsável pela penetração ativa nas células nucleadas e pela formação de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula parasitada b) um núcleo com membrana dupla, uma externa e contínua e outra interna (DOBROWOLSKI & SIBLEY, 1996). Os taquizoítos se multiplicam rapidamente até a ruptura da célula e, em seguida, são disseminados livres pelo sistema linfático e sanguíneo infectando vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central, olhos, musculatura esquelética, cardíaca e placenta.

O cisto contém os bradizoítos que são morfológicamente semelhantes aos taquizoítos, mas possuem uma replicação lenta, sendo a forma de resistência do *T. gondii* nos tecidos, encontrada durante a fase crônica da infecção (FRENKEL, 1973). E por último o oocisto, que possui uma parede dupla bastante resistente às condições do meio ambiente. São produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e eliminados ainda imaturos junto com as fezes, quando maduros contêm dois esporocistos e oito esporozoítos que são as formas infectantes para os mamíferos e aves e também para o ser humano (FRENKEL, 1973).

Os hospedeiros intermediários podem adquirir o *T. gondii* pela ingestão de tecidos de animais infectados com cistos, alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, ou por transmissão transplacentária. Após a ingestão, os bradizoítos ou esporozoítos são liberados e invadem o tecido intestinal, transformam-se em taquizoítos, multiplicam-se localmente por

endodiogenia e se disseminam por todo o organismo pela via hematogena ou linfática (DUBEY et al. 2004).

Com o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro os taquizoítos encistam-se nos tecidos e a última geração destes darão origem aos bradizoítos, 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).

A infecção assintomática por *T. gondii* é comum em humanos, tornando-se latente com a formação de cistos teciduais. Já a infecção sintomática é menos frequente. Pacientes imunocomprometidos e gestantes são considerados os grupos de maior risco para a infecção aguda. A toxoplasmose congênita ocorre quando a mãe sem anticorpos contra a doença adquire esta durante a gestação, passa por uma infecção assintomática, mas que pode trazer graves consequências para o feto (DUBEY; WEISS, 2009).

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).

## **2.2 Roptrias, Fração Total e ROP2**

As roptrias ocupam cerca de 10-30% do volume total da célula, estão presentes em número de 8-12 por célula (SHAW et al., 2002). São organelas secretoras que atuam no processo de invasão celular, sendo responsáveis por formar dentro da célula hospedeira o vacúolo parasitóforo, impedindo a degradação do *T.gondii* pela maquinaria da célula hospedeira e permitir a propagação intracelular do parasita. Sendo assim seus produtos são ótimos candidatos para a produção de vacinas (DLUGONSKA, 2008).

Roptrias têm sido isoladas de taquizoítos de *T. gondii* por fracionamento subcelular em gradiente de densidade de sacarose. São observadas cinco bandas, e após microscopia eletrônica de transmissão destes observou-se que roptrias estavam na faixa 3. A fração 1 contém estruturas de membrana de

parasitas. Já a fração 2 contém membranas e mitocôndrias. A fração 4 contém estruturas conóides e a fração 5 possui bandas fantasmas (GARCIA et al., 2004).

Algumas proteínas do *T. gondii* são verificadas nos três estágios do parasita entre elas estão a ROP2 (VERCAMMEN et al., 2000) GRA5 (TILLEY et al., 1997) e a GRA7 (FERGUSON et al., 1999).

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) encontraram três potenciais epítomos no antígeno ROP2 reconhecidos por células T humanas.

A fração total é obtida através da centrifugação simples dos taquizoítos retirados de lavado peritoneal, neste material está contido as proteínas de todas as frações separadas pelo gradiente de sacarose, sendo que a utilização deste material apresenta vastas ligações responsáveis pela resposta imunológica nos hospedeiros (GARCIA et al, 2004).

### **2.3 Toxoplasmose Congênita**

A Toxoplasmose Congênita é resultado de transmissão transplacentária de *T. gondii*, e quando a mãe adquire a infecção durante o início da gravidez, pode causar aborto ou malformações (DUNN et al., 1999). Portanto, crianças infectadas podem apresentar, em nascimento, os sinais e sintomas da toxoplasmose congênita conhecidos como Tétrade de Sabin (SABIN, 1942) (hidrocefalia, coriorretinite, retardo mental e calcificação cerebral) ou podem nascer sem sintomas ou sinais clínicos e desenvolver seqüelas durante a infância ou, até mesmo, em idade adulta.

As gestantes na fase aguda da doença podem abortar, desenvolver partos precoces ou a termo, gerar crianças saudias ou apresentando anomalias leves à graves (DETANICO e BASSO, 2009).

No Brasil a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* variam entre 31,0% até 91,6% (DETANICO e BASSO, 2009; LOPES-MORI et al., 2009; REICHE et al., 2000; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005) , e a incidência de toxoplasmose congênita varia entre 0,3 até 5,0 por 1000 nascimentos (NETO et al., 2000.; SEGUNDO et al., 2004; LAGO et al., 2009).

A toxoplasmose congênita pode ser classificada em três grupos. O primeiro grupo é o mais grave, em que ocorre morte fetal ou natimortalidade. Já o segundo grupo tem descendentes com sinais e sintomas graves e detectados já no nascimento, enquanto o terceiro grupo é constituído por crianças que nascem sem manifestações durante o período de recém-nascido, mas apresenta sinais ou sintomas da toxoplasmose tardias, como coriorretinite manifestada adolescência (REMINGTON et al., 2006).

A tríade clássica de coriorretinite, calcificações intracranianas e hidrocefalia é encontrada em menos que 10% das crianças infectadas (DUBEY & BEATTIE, 1988).

Muitas vezes o diagnóstico sorológico das gestantes é dificultado pela falta de informação e não acompanhamento pré-natal destas mulheres, fazendo com que crianças infectadas acabem nascendo e não recebendo acompanhamento adequado. Programas de triagem para toxoplasmose gestacional foram desenvolvidos para padronizar condutas para que as gestantes recebam acompanhamento e quando necessário tratamento para evitar maiores prejuízos nas crianças infectadas durante seu desenvolvimento fetal (MITSUKÁ-BREGANÓ ; LOPES-MORI, NAVARRO, 2010). Estes programas consistem em submeter as gestantes a exames periódicos afim de detectar soroconversão durante a gestação, e quando isso for constatado iniciar o tratamento imediatamente (SPALDING et al., 2003).

A transmissão congênita não ocorre somente em humanos, mas também em animais de produção tais como matrizes suínas, ovelhas e cabras que apresentam prevalência mais alta, porém também pode afetar o gado. Essa infecção tem grande importância, pois apresenta altas implicações econômicas, uma vez que pode causar prejuízos relativos a abortos e baixo ganho de peso nos animais afetados (TENTER et al., 2000).

Modelos experimentais utilizando camundongos são constantemente utilizados para estudar a transmissão vertical da toxoplasmose, pois reproduzem a proteção contra a transmissão transplacentária do parasita para o feto, tornando este um modelo particularmente relevante no que diz respeito à infecção humana (ROBERTS e ALEXANDER, 1992).

## 2.4 Resposta Imune

A infecção por *T. gondii* raramente apresenta sinais clínicos no hospedeiro, no entanto, a severidade da doença, quando esta ocorre, esta 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).

Além disso, os monócitos/macrófagos, as células dendríticas e os fibroblastos podem produzir IL-6, uma citocina que atua sinergicamente com TNF- $\alpha$ . Esta citocina induz a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e a diferenciação das células T citotóxicas (FILISSETTI e CANDOLFI , 2004).

As quimiocinas são essenciais para o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e células T para o local da infecção com *T. gondii* e os seus receptores desempenham um papel importante na imunidade inata (DEL RIO et al., 2001).

A proteína ROP2 que tem uma massa molecular de 54-55 kDa foi reconhecida por um clone de célula T humana isolada de um doador imune, o qual era específico para o parasita e produziu níveis elevados de IFN- $\gamma$  (HERION E SAAVEDRA, 1991; SAAVEDRA et al., 1991); este evento corresponde aos antígenos da família roptrias.

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 extracelular do parasita (MINEO et al., 1994)

Bonenfant et al. (2001) vacinaram camundongos pela via nasal com SAG1 associada a enterotoxinas, utilizadas como adjuvantes, e obtiveram proteção contra a formação de cistos cerebrais de *T. gondii*, relacionada aos altos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Igarashi et al. (2008) demonstraram uma diminuição na formação de cistos teciduais em camundongos Balb/c vacinados pela via nasal com proteínas recombinantes de *T. gondii* quando comparados ao grupo controle negativo.

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

## **2.5 Vacinas contra o *T. gondii***

A vacinação dos animais domésticos pode ser uma das estratégias para o controle do *T. gondii* e tem dois objetivos, reduzir as perdas econômicas provocada pelos danos reprodutivos e reduzir o número de cistos teciduais. Assim, pode-se diminuir o risco da infecção ao homem pela ingestão de cistos em carnes cruas ou mal cozidas (DUBEY, 1996).

Embora a vacinação seja uma medida importante no controle da toxoplasmose, atualmente, apenas uma vacina (TOXOVAX<sup>®</sup>) é comercializada na Nova Zelândia, Grã-Bretanha, França e Irlanda para uso em ovinos e caprinos, e apresenta alguns inconvenientes, como risco de contaminação do operador, tem alto custo, além de levar o animal a apresentar sinais clínicos e não pode ser administrada próximo às estações de monta ou durante a gestação (BUXTON, 1993).

A literatura apresenta alguns protocolos de vacinação para prevenção de toxoplasmose congênita, (MCLEOD et al., 1988; ROBERTS et al, 1994), e também para a forma não congênita (IGARASHI et al., 2008; MARTIN et al, 2004.; ROQUE-RESÉNDIZ et al., 2004; VERCAMMEN et al.,2000), porém quando os protocolos vacinais apresentam a proteína recombinante ROP2 ela sempre esta associada a outras proteínas, da família das ROPs (DLUGONKA, 2008), ou mesmo, com diferentes tipos de vetores utilizados no crescimento das proteínas *in vitro*.

Os estudos em vacina para *T. gondii* apresenta uma variedade de combinações de antígenos que são capazes de estimular a resposta imunológica e proteger frente a infecções congênitas: vacinas de DNA multigênicas (HOSEINIAN et al., 2011; YUAN et al., 2011), vacinas utilizando taquizoítos modificados (ZHAO et al, 2013) e vacinas com proteínas recombinantes (DZIADEK et al., 2009; DZIADEK et al., 2011; IGARASHI et al., 2008).

McLeod et al (1988), verificaram que a imunização por via subcutânea com cepa Ts4 em camundongos Swiss Webster, não foi suficiente para proteger a transmissão congênita, porém nos animais imunizados com esta mesma cepa mas por outra via de administração, a intrainestinal, obteve-se proteção parcial correspondente a 36%.

Em outro estudo, Roberts et al.(1994), imunizando camundongos BALB/c por via subcutânea com antígenos STAG obteve proteção contra a infecção congênita grave, como aborto e natimortos, pois todos os filhotes conseguiram alcançar a maturidade.

Igarashi et al. (2009), obtiveram obter proteção contra a transmissão congênita em camundongos BALB/c, imunizados pela via intranasal com antígeno recombinante rROP2 e desafiados com cepa ME-49. Após bioensaio em camundongos Swiss Webster não observou-se positividade pela imunofluorescência, nem presença de cistos cerebrais.

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.

Suínos também são utilizados nos estudos de vacina para prevenção da formação de cistos teciduais. As vacinas utilizadas na imunização e para desafio dos animais são as mesmas utilizadas nos estudos com camundongos, porém diferenciadas pela dose dos inóculos. Dubey, Urban e Davis (1991), obtiveram resultados contra aparecimento de sinais clínicos e redução do número de cistos teciduais utilizando como imunizante a cepa RH do *T. gondii*.

Freire et al., (2003) observaram aumento na resposta imune humoral dos suínos testados utilizando vacinas contendo antígenos de superfície da cepa LIV-5 associadas ao imunoestimulante ISCOM. Utilizando como antígeno as roptrias e para desafio a cepa VEG, Garcia et al. (2005) obtiveram proteção parcial contra a formação de cistos teciduais em suínos. Também utilizando roptrias associadas ao Quil-A para imunização dos suínos, Cunha et al. (2012) detectaram proteção parcial na formação de cistos teciduais, após desafio com cepa VEG de *T. gondii*.

Zulpo et al. (2012), testaram uma vacina em gatos utilizando como imunizante as roptrias associadas ao Quil-A. A via de administração foi intranasal e

como resultado os autores obtiveram a diminuição da eliminação de oocistos em gatos. Como hospedeiros definitivos deste agente e responsáveis pela eliminação de milhares de oocistos nas fezes, estudos neste sentido são considerados fundamentais para o controle da propagação da infecção no ambiente (DUBEY, 1996; GARCIA, 2009).

## REFERENCIAS

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, n.3, 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.

CUNHA, I. A. L.; ZULPO, D. L.; BOGADO, A. L. G. et al. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 216 – 221, 2012.

DEL RIO L, BENNOUNA S, SALINAS J, DENKERS EY. CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v.167, n. 11, 6503-09, 2001

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

DETANICO, L.; BASSO, R. M. C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 15-18, 2006.

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

DOBROWOLSKI, J.M.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, n.84, p.933-939, 1996.

DUBEY JP, BEATTIE CP. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press; 1988.

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

DUBEY, J. P.; URBAN, J. F.; DAVIS, S. W. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 1316-1319, 1991.

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.

DUNN D, WALLON M, PEYRON F, PETERSEN E, PECKHAM C, GILBERT R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet**. May 29;353(9167):1829-33, 1999.

DZIADEK, B.; GATKOWSKA, J.; BRZOSTEK, A. DZIADEK J, DZITKO K, GRZYBOWSKI M, DLUGONSKA H. Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis. **Vaccine**, v. 29, n. 4, p. 821–830, 2011.

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**. v. 123, n. 1, p.81–89, 2009.

FERGUSON DJ, JACOBS D, SAMAN E, DUBREMETZ JF, WRIGHT SE. In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. v.119 n.3, p.259-65. 1999.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A., LOPES, A.H.A., SENEFONTE, F.R.A., SOUZA JÚNIOR, V.G., BOTELHO, C.A., FIGUEIREDO, M.S., DUARTE, G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em Estado da Região do Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, p. 442–9.11, 2005.

FILISSETTI D, CANDOLFI E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità** v.40, n.1, p. 71-80. 2004.

FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; BRACARENSE, A.P.F.R.L., GENNARI, S.M. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (ISCOMS). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 388-396, 2003.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis. Mechanisms of infection, laboratory diagnosis and management. **Current Topics in Pathology**, v. 54, p. 28–75. 1971.

FRENKEL, J.K. *Toxoplasma* in and around us. **BioScience**, n. 23, p. 343–352, 1973.

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 RZ, Sinhorini IL, Freire RL, Marana ER, Tsutsui V, Contente AP, Begale LP. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 209–217, 2005.

GARCIA, J.L.; INNES, E.A.; KATZER, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Vaccine: Development and Therapy** V.4, P. 23–37. 2014.

GAZZINELLI RT, HAKIMFT, HIENY S, SHEARERGM, SHER A. Synergistic role of CD4 $\beta$  and CD8 $\beta$ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**, v.146, p.286-92, 1991.

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.

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

HOSEINIAN KHOSROSHAHI K, GHAFARIFAR F, D'SOUZA S, SHARIFI Z, DALIMI A. Evaluation of the immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete SAG1 and ROP2 genes against toxoplasmosis. **Vaccine**, v. 29, n.4, p. 778–783, 2011.

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** v.118, p -392, 2008.

IGARASHI, M., *Toxoplasma gondii*: Produção de Proteína Recombinante rROP2 e avaliação da proteção contra infecção congênita em camundongos. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2009.

JONES J.L., DUBEY J.P. Waterborne toxoplasmosis: Recent developments. **Experimental Parasitology**;124:10–25. 2010.

LAGO E.G., CARVALHO R.L., JUNGBLUT R., SILVA V.B., FIORI R.M. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. **Scientia Medica** v.19, p.27–34, 2009.

LOPES F.M., MITSUKA-BREGANÓ R, GONÇALVES DD, FREIRE RL, KARIGYO CJ, WEDY GF, MATSUO T, REICHE EM, MORIMOTO HK, CAPOBIANGO JD, INOUE IT, GARCIA JL, NAVARRO IT. Factors associated with the seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**; 104:378–82.9, 2009.

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 gondii*-specific immunoglobulins A, M e G with a recombinant *toxoplasma gondii* rop2 protein. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology** 5, 627-631, 1998.

MAENZ M, SCHLÜTER D, LIESENFELD O, SCHARES G, GROSS U, PLEYER U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, Mar;v. 39, p.77-106, 2014.

MCLEOD R, FRENKEL JK, ESTES RG, MACK DG, EISENHAUER PB, GIBORI G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. **Journal of Immunology**. v.140, n.5, p.1632–1637, 1988.

MENZIES, F.M.; HENRIQUEZ, F.L.; ROBERTS, C.W. Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model. **Immunology Letters** v.115, p.83–89, 2008.

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.

MINEO JR, KHAN IA, KASPER LH. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. **Experimental Parasitology**, v. 79, n.3, p.351-61, 1994.

MINEO JR, MCLEOD R, MACK D, SMITH J, KHAN IA, ELY KH, KASPER LH. 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**. v. 150, n.9, p. 3951-64, 1993.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p.1965-1976, 2004.

NETO E.C., ANELE E., RUBIMA R, BRITESA, A., SCHULTEA, J. BECKRS, D. TUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in 3-year old prospective neonatal screening study. **The International Journal of Epidemiology**, v. 29, p.941–7.12, . 2000.

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

PETERSEN E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v.12, n.3, p.214–23, 2007.

REICHE EM, MORIMOTO HK, FARIAS GN, HISATSUGU KR, GELLER L, GOMES AC, INOUE HY, RODRIGUES G, MATSUO T. Prevalência da tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a1998 no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná(Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p.519–27, 2000.

REMYINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington & Klein, Wilson & Baker; *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6<sup>a</sup>. ed. Ed. Elsevier Saunders, Philadelphia - USA; 2006; chap. 31, p. 947-1091.

ROBERTS CW, BREWER JM, ALEXANDER J. Congenital toxoplasmosis in the balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by Vaccination. **Vaccine** v.12, n15, p. 1389–1394,1994.

ROBERTS, C.W., ALEXANDER J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in Balb/c mice infected for the first time during pregnancy. **Parasitology** 104, 19-23, 1992.

ROQUE-RESÉNDIZ JL, ROSALES R, HERION P. MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis. **Parasitology** v.128, n.4, p.397–405, 2004.

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 AND HERION P. Human T-cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of interferon-gamma, interleukin-2, and strain cross-reactivity. **Parasitology. Res.** 77: 379-385, 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*. **Infectious and Immunity**, v. 64, p. 3858-3862, 1996.

SABIN, A. B. Toxoplasmosis: recently recognized disease. **Advances in Pediatrics**, v. 1, p. 1-54, 1942.

SEGUNDO G.R.S., SILVA D.A.O., MINEO J.R., FERREIRA M.S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil **Journal of Tropical Pediatrics**, v.50: 50–3.13, 2004.

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.

Spalding, S. M.; Amendoeira, M. R. R.; Ribeiro, L. C.; Silveira, C.; Garcia, A P.; Camillo-Coura, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.4, p. 483-491, 2003.

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.

SUPPLY P., SUTTON P., COUGHLAN S.N., BILO K., SAMAN E., TREES A.J., CESBRON DELAUW, M.F., LOCHT C. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v.17 p. 705-14, 1999.

TENTER AM, HECKEROTH AJ, WEISS LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.1217–58, 2000.

TILLEY M., FICHERA M.E., JEROME M.E., ROOS D.S., WHITE M.W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. **Infection and Immunity**, v.65, n.11, p.4598-605, 1997.

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. **Infection 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**, p.38-45, 2000.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 520–562, 2002.

WEISS, L.M.; DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International Journal Parasitology**, n.39, v.8, p. 895–901, 2009.

WONG SY, REMINGTON J. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infection Disease** 1994; 18:853–62.

YUAN ZG, ZHANG XX, HE XH, PETERSEN E, ZHOU DH, HE Y, LIN RQ, LI XZ, CHEN XL, SHI XR, ZHONG XL, ZHANG B, ZHU XQ. Protective immunity induced by *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 16 against toxoplasmosis in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p.119–124, 2011.

ZHAO Y, HUANG B, HUANG S, ZHENG H, LI YQ, LUN ZR, SHEN J, WANG Y, KASPER LH, LU F. Evaluation of the adjuvant effect of pidotimod on the immune protection induced by UV-attenuated *Toxoplasma gondii* in mouse models. **Parasitology Research**, v. 112, n.9; p. 3151–3160, 2013.

ZULPO DL, HEADLEY SA, BIAZZONO L, DA CUNHA IA, IGARASHI M, DE BARROS LD, TARODA A, CARDIM ST, BOGADO AL, NAVARRO IT, GARCIA JL. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 223–230, 2012.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune e a proteção contra a forma congênita da toxoplasmose em camundongos BALB/c imunizados com proteínas nativas e proteína recombinante (rROP2) do *T. gondii*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Isolar proteínas nativas do *Toxoplasma gondii*;
- Produzir e purificar proteína recombinante rROP2 do *Toxoplasma gondii*;
- Imunizar camundongos BALB/c com proteínas nativas e rROP2 do *Toxoplasma gondii* pela via subcutânea e posteriormente, desafiar taquizoítos pela via intraperitoneal
- Avaliar a resposta imune humoral e sistêmica em BALB/c imunizados com proteínas nativas e recombinante rROP2 do *T. gondii*.
- Avaliar a proteção contra a transmissão congênita do *T. gondii* nos animais desafiados.
- Avaliar a taxa de sobrevivência em animais vacinados e desafiados com cepa RH do *T. gondii*.

#### 4 ARTIGO

### PROTEÇÃO CONTRA A TRANSMISSÃO CONGÊNITA DO *TOXOPLASMA GONDII* EM CAMUNDONGOS BALB/c

#### RESUMO

A toxoplasmose congênita é causada por transmissão materno - fetal de *Toxoplasma gondii* para o feto, quando a mãe se infecta pela primeira vez, ou raramente, como um resultado de uma recrudescência de uma infecção da mãe durante a fase crônica. O presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral, taxa de sobrevivência, e proteção contra a transmissão congênita em camundongos BALB/c vacinados com proteínas nativas e recombinantes do *T. gondii*. Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo 1 (15 µg de rROP2 + 10 µg de QuilA n=15); grupo 2 (15 µg de Proteínas Nativas (roptrias) + 10 µg de QuilA n=15); grupo 3 (15 µg de Fração Total + 10 µg de QuilA n=15); grupo 4 (10 µg de QuilA n=15); grupo 5 (Solução de NaCl 0,9% n=15). Foram administradas três doses de vacina nos dias 0, 21 e 42, pela via subcutânea. Os animais foram colocados para cruzamento em caixas separadas respeitando a proporção de um macho para três fêmeas, sete dias após a última dose. O desafio dos animais ocorreu no 13º dia da gestação via intraperitoneal com 10<sup>3</sup> taquizoítos da cepa RH do *T. gondii*. Animais dos G1, G2 e G3 tiveram nascimentos prematuros. O teste de ELISA demonstrou altos níveis de anticorpos em animais vacinados. Um maior número de animais vacinados sobreviveu após a infecção, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os animais do grupo 1 e do grupo 3 não demonstraram transmissão congênita para *T. gondii*, diferentemente dos grupo G2 (50%), G4 (100%), G5 (29%).

**Palavras-chave:** vacina; rROP2; roptrias; fração total; BALBc.

## THE PROTECTION AGAINST THE CONGENITAL TRANSMISSION OF *TOXOPLASMA GONDII* IN BALB/c MICE

### ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis is caused by maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* to fetus, when pregnant woman acquires a primary infection, or rarely, as result of recrudescence infection during the chronic phase, which could cause chorioretinitis, intracranial calcifications, hydrocephalus, mental abnormalities and also spontaneous abortion and neonatal death. The aim of this study was to evaluate the humoral immune response, surviving rate and protection against congenital transmission in BALB/c mice vaccinated with native and recombinant proteins of *T. gondii*. The animals were divided into five groups: group 1 (G1, 15 µg of rROP2 + 10 µg of QuilA n=15); group 2 (G2, 15 µg of Fraction 3 (roptries) + 10 µg of QuilA n=15); group 4 (G4, 10 µg of QuilA n=15); group 5 (G5, NaCl 0,9% solution n=15). Three doses of vaccine were administered subcutaneously on days 0, 21 and 42 for each group. The animals were group-housed in separate boxes and mated at a ratio of one male to three females, seven days after the last dose. The mice were infected on 13 days of gestation by intraperitoneal injection with  $10^3$  tachyzoites of RH strain. The animals from G1, G2 and G3 had premature births. The ELISA test showed high levels of antibodies in vaccinated animals. Most of vaccinated mice survived after infection, however this was not statistically significant. The mice from group 1 and group 3 did not show signs of congenital infection with *T. gondii*, differently from G2 (50%), G4 (100%) and G5 (29%). The obtained results indicate that both rROP2 and native proteins fraction were able to stimulate the immune response.

**Keywords:** vaccine; congenital; recombinant protein; roptries; transmission.

## INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário que pode infectar os humanos e todos os animais homeotérmicos (DUBEY, 2010). A toxoplasmose congênita é causada por transmissão materno - fetal quando a mãe se infecta pela primeira vez, ou raramente, como um resultado de uma recrudescência de uma infecção da mãe durante a fase crônica (WONG e REMINGTON, 1994; MONTOYA e LIESENFELD, 2004), podendo resultar em coriorretinite, calcificações intracranianas, hidrocefalia, retardo mental e até mesmo aborto espontâneo e morte neonatal (PETERSEN, 2007).

Durante a fase aguda da infecção na gestante além dos abortos, pode ocorrer partos precoces e a termo, e as crianças geralmente não apresentam sintomas ao nascimento, levando a complicações em outras fases da vida (DETANICO e BASSO, 2009).

Devido ao impacto da toxoplasmose na saúde pública e nos prejuízos com a produção animal decorrentes da infecção, há considerável interesse na produção de vacinas contra a forma congênita (INNES et al., 2007).

A rROP2 de *T. gondii* é uma proteína que está presente em todos os estágios do parasita, sendo reconhecida pelas células T humanas (SPEER et al., 1995). Por essas razões, a proteína ROP2 do *Toxoplasma gondii* foi identificada como candidata à vacina (GARCIA et al., 2014) e seu uso como imunógeno foi avaliado em diversos estudos envolvendo camundongos, obtendo resposta imune humoral e celular e redução na formação de cistos teciduais (VERCAMMEN et al., 2000; MARTIN et al. 2004; IGARASHI et al., 2008; DZIADEK et al., 2009, 2011, 2012; IGARASHI et al. 2010; SANCHEZ et al., 2011) e em gatos, objetivando a redução da eliminação de oocistos (ZULPO, 2014).

No Brasil a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gestantes variam entre 31,0% até 91,6% (DETANICO e BASSO, 2009; LOPES-MORI et al., 2009; REICHE et al., 2000; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005) ,e a incidência de toxoplasmose congênita varia entre 0,3 até 5,0 por 1000 nascimentos (NETO et al., 2000.; SEGUNDO et al., 2004; LAGO et al., 2009).

A imunidade para o *T. gondii* desenvolvida por uma vacina deve associar o local correto de imunização, bem como o uso de proteínas do parasita

que promovam proteção adequada, pois o parasita pode expressar diferentes antígenos em diferentes estágios (GARCIA et al, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral, sobrevivência, e proteção contra a transmissão congênita em camundongos BALB/c vacinados com proteínas nativas e recombinantes do *T. gondii*.

## **Material e Métodos**

### ***Local de Realização***

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina.

### ***Animais***

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais no presente trabalho foram submetidos para a apreciação, avaliação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa instituição – (CEUA 47/06).

Foram utilizados camundongos albinos fêmeas Swiss Webster, entre 45 a 60 dias, para replicar a cepa RH pela via intraperitoneal e camundongos BALB/c fêmeas entre 45 a 60 dias (25 – 40g) para avaliação da toxoplasmose congênita.

### ***Amostras do Toxoplasma gondii***

Amostras de cepa RH (não cistogênica do Tipo I) do *T. gondii* (SABIN et al., 1941), foi utilizada para obtenção de taquizoítos e posterior isolamento das proteínas nativas e recombinantes do parasita, para realização do Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e desafio dos animais.

Taquizoítos da cepa RH foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal de 40 camundongos, 48h horas depois de inoculados pela via intraperitoneal com  $10^5$  taquizoítos vivos.

### ***Proteínas Nativas do Toxoplasma gondii***

As proteínas nativas do *T. gondii* foram isoladas segundo metodologia descrita por Garcia et al. (2004).

Após a obtenção dos taquizoítos, 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 ressuspensão em TES ( $10^9$  taquizoítos/ml) e os taquizoítos foram rompidos mecanicamente aplicando-se uma pressão de  $50\text{Kgcm}^3$ . 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 proteínas de roptrias (1,4M) e a banda contendo proteínas totais foram cuidadosamente recolhidas e novamente homogeneizada com TES e centrifugada a  $120.000 \times g$  isoladamente cada uma. A concentração das proteínas foi determinada pelo método de ácido bicinonínico (BCA Protein Assay Reagente, Pierce), tendo como padrão soro albumina bovina e a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

### ***Obtenção das Proteínas Recombinantes***

As proteínas recombinantes foram obtidas segundo metodologia descrita por Igarashi et al. (2010).

#### ***Construção dos Plasmídeos***

A sequência de DNA do gene que codifica o antígeno de ROP2 do *Toxoplasma gondii* foi obtido no banco de dados Genbank (número de acesso: Z36906). O DNA genômico de *T. gondii* foi isolado de taquizoítos da cepa RH e foi usado como molde para a amplificação do gene ROP2 usando protocolo de PCR convencional. O produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O antígeno ROP2 (nt 1022-2125) tem uma massa molecular de 54 kDa. O quadro de leitura ROP2 foi amplificado utilizando as sequências iniciadoras ROP2F (5'ATCGAATTCACGGATCCTGGAGAC3'- introduzido local de reconhecimento de *EcoRI*, sublinhado) e ROP2R (5'TGAAAAGCTTTTCATGCCGGTTCTCC3'- introduzido

o local de reconhecimento *Hind III*, sublinhado) por um ensaio de PCR. O produto da PCR foi obtido com 1103 pb. O fragmento foi digerido durante uma noite com as endonucleases *EcoRI* e *HindIII* e ligado em pTrcHis B (Invitrogen, Life Technologies, EUA) segundo recomendações do fabricante.

Cada produto de PCR foi purificado usando Kit de purificação QIAquick (Qiagen) e o produto de PCR específico foi obtido após a digestão com a respectiva enzima de restrição. Após isso, o fragmento foi precipitado com etanol a 100% e 3M acetato de sódio e foi ligado no correspondente vetor pTrcHis utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen, Life Technologies, EUA) e introduzido em células de *Escherichia coli* DH5. Colônias portando plasmídeo recombinante pTrcHis-TgROP2 foram identificadas por PCR usando sequencias iniciadoras para o vetor pTrcHis. O fragmento de DNA clonado no plasmídeo foi sequenciado pelo método dideoxi, também utilizando iniciadores específicos para o vetor pTrcHis e confirmada a manutenção da estrutura usando o software Sequencher.

#### *Condições de Cultura*

Os plasmídeos recombinantes de DNA pTrcHis-TgROP2 foram transformados em *E. coli* Rosetta (DE3) e cultivadas em agitação (50ml de LB; 37 °C; 100 µg /ml ampicilina e 100µg/ml cloranfenicol; DO600 = 0,8) e, em seguida, foi induzida a expressão de proteínas (1 mM isopropil-Dthiogalactopyranoside-IPTG; 4 h; 37 °C).

As células foram centrifugadas (2500 x g; 5 min.) e o sedimento suspenso (fosfato de sódio 20 mM; cloreto de sódio 500 mM; pH 7,8), lisadas por três ciclos de congelamento-descongelamento para a fase solúvel, incubadas (30 min.; 25 °C; 1 µg.ml<sup>-1</sup> DNase e RNase) e centrifugadas (3000 x g; 15 min.; 4 °C). A fracção solúvel foi recolhida após centrifugação e utilizadas na purificação da proteína recombinante.

#### *Purificação de rTgROP2*

A fracção solúvel foi aplicada em coluna de resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen) pré-equilibrada (20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 500mM NaCl; pH 7,8) por 30 minutos a 25°C. A *E. coli* e as proteínas não ligadas foram removidas da coluna por escoamento em gravidade e as resinas NiNTA foram lavadas (20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

500mM NaCl; pH 6,8). O antígeno solúvel recombinante foi eluído da resina por fluxo de gravidade com tampão nativo de eluição (200mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5M de NaCl; pH 4,0).

O antígeno TgROP2 recombinante purificado foi submetido a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e coloração de Comassie coloidal seguindo procedimento padrão. As concentrações da proteína foram determinadas pelo BCA Protein Assay Reagent (Pierce Chemical Co.).

### ***Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)***

A presença de anticorpos anti-rROP2 e anti proteínas nativas do *T. gondii* no soro dos camundongos, durante todo o experimento, foi avaliada pelo ELISA para detecção de IgG, segundo metodologia descrita por Garcia et al. (2005). Placas de ELISA (microplacas Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Denmark) contendo 96 cavidades foram adsorvidas com 5µg/ml de proteínas recombinantes (ROP2) ou com 5µg/ml de proteínas nativas (IGARASHI et al., 2010) em 0,1M de tampão carbonato-bicarbonato 9,6 na concentração de 5µg/ml de proteínas, e distribuída 100µl em cada cavidade das microplacas posteriormente incubadas a 4°C por 12 horas. As placas foram bloqueadas com 200µl de tampão de bloqueio (tampão carbonato-bicarbonato 8% de leite em pó desnatado) por 1 h. Foram adicionadas em duplicata, 0,1ml de alíquotas de soros diluídas (1:100), incluindo os controles positivos e negativos, em tampão PBS-tween 20 adicionado de 5% de leite em pó desnatado e incubadas durante uma hora a 37 °C. Conjugado anti-IgG (1:5000) mouse marcados com peroxidase foram utilizados para detectar a presença de anticorpos. Após cada etapa as microplacas foram lavadas três vezes com tampão PBS-tween 20 (10Mm TRIS-HCl e 150 Mm NaCl, pH 7,5) em equipamento lavador de placas (Bio-Rad ImmunoWash – Model 1575).

A reação foi revelada pela solução de substrato cromógeno(40µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%); 40 mg de OPD (*Ophenylenediamine dihydrochloride*-Sigma; 100ml de 0.1M tampão fosfato /citrate, pH 6,0 e 40 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e interrompida com 50µl de solução 0,1M de ácido clorídrico. A densidade Optica (DO) a 490nm foi avaliada em um leitor de placas iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad).

Os títulos de anticorpos foram determinados segundo Garcia et al., (2006) e Cunha et al., (2012). Primeiramente foram obtidos os índices, para padronização dos resultados obtidos entre cada teste de ELISA, segundo a fórmula:

DO média da amostra =  $[(DO \text{ amostra}) - (DO \text{ controle negativo}) / (DO \text{ controle positivo}) - (DO \text{ controle negativo})]$ . As densidades óticas corrigidas foram obtidas através de cálculo de tendência linear tendo como parâmetros as médias das DO dos controles positivo (n=15) e negativo (n=15) e os índices calculados em cada placa de ELISA. As amostras foram consideradas positivas quando DO média da amostra  $>[(DO \text{ controle negativo; n=15}) + 2 \text{ desvios padrão (controle negativo; n=15)}]$ .

### ***Delineamento Experimental***

Setenta e cinco camundongos fêmeas BALB/c foram divididas em cinco grupos com animais 15 cada (Quadro 1). O grupo 1(G1) recebeu 15µg de rROP2 mais 10µg de Quil- A; o grupo 2 (G2) recebeu 15µg de proteínas nativas de roptrias mais 10µg de Quil-A; o grupo 3 (G3) recebeu 15µg de proteínas totais mais 10µg de Quil- A; o grupo 4 (G4) recebeu 10µg de Quil-A e o grupo 5 (G5) recebeu Solução de NaCl 0,9%.

Todos os grupos receberam um total de três doses (dias 0, 21, 42) pela via subcutânea, sendo a última dose dada sete dias antes do acasalamento das fêmeas. A sincronização de cio foi feita por 48hs antes de serem acasaladas numa proporção de três fêmeas por macho, em caixas separadas, nas quais os 4 animais permaneceram por 72h. As fêmeas foram desafiadas com  $10^3$  taquizoítos da cepa RH pela via intraperitoneal no 13º dia após o acasalamento e verificação do *plug* vaginal (dia 65). Três dias após a infecção (dia 68).

No 19º dia de gestação, procedeu-se à eutanásia de todas as fêmeas prenhes, bem como dos animais que nasceram pré-termo para avaliação da transmissão materno-fetal. Os fetos e as placentas foram removidas separadamente de forma asséptica, diluídos em 1ml de solução de NaCl 0,9% para obtenção de macerado, utilizado na detecção de DNA de *T. gondii* por meio da técnica de Nested-PCR.

As fêmeas que não estavam prenhes foram mantidas por 40 dias após o desafio para determinação da taxa de sobrevivência frente à infecção com a cepa RH.

Foram colhidas amostras de sangue para obtenção de soro de todos os animais nos dias 0, 20, 41, 56 do experimento para a realização das provas de ELISA (IgG) para a presença de anticorpos anti-*T.gondii*. No dia 68, o sangue foi colhido somente dos animais que sofreram eutanásia (três de cada grupo), bem como no dia 71 somente foi realizada coleta dos animais que tiveram filhotes, e das fêmeas prenhas.

### **Extração do DNA e Nested PCR**

A extração do DNA dos materiais provenientes dos macerados dos fetos foi realizada por meio de kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies) e o procedimento será se deu de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do DNA do *T. gondii* para realização da Nested PCR seguiu a metodologia descrita por Hurtado et al. (2001), baseada no gene ITS-1. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a primeira reação foram NN1 – TCAACCTTTGAATCCCAA e NN2 – CGAGCCAAGACATCCATT e para a segunda reação foram NP1 – GTGATAGTATCGAAAGGTAT e NP2 – ACTCTCTCTCAAATGTTCT.

### **Análise Estatística**

As diferenças estatísticas entre as respostas imunes foram avaliadas pelos testes de ANOVA e quando foi o caso pelo teste de Kruskal-Wallis. O teste t de Student foi utilizado para identificar diferenças entre as médias. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para verificar diferenças estatísticas nos resultados da transmissão congênita e a determinação da taxa de sobrevivência dos animais foi avaliada pelo teste Log-rank (Mantel-Cox). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

A proteção contra transmissão congênita foi averiguada pela estimativa de fração de prevenção (FP) descrita por Siev (1994). Essa fração é calculada baseada na fórmula:  $FP = p_2 - p_1 / p_2$ , quando  $p_2 = \%$  de camundongos positivos do grupo controle negativo (G5) e  $p_1 = \%$  de camundongos positivos dos grupos G1, G2, G3 e G4.

## RESULTADOS

Não foi detectado DNA de *Toxoplasma gondii* para os fetos do G 1 e do G 3 (0%), evidenciando que nestes animais não houve transmissão congênita. Os animais do G 2, houve proteção parcial, pois 50% dos animais avaliados não apresentaram transmissão vertical da infecção. Nos grupos-controle, G 4 e G 5, a taxa de transmissão congênita foi de 100% e 29% respectivamente.

O cruzamento dos animais não foi totalmente eficaz, pois a taxa de prenhez foi considerada baixa para todos os grupos avaliados, variando entre 6,67% a 20% (Tabela 1). Verificamos que a partir de 15 animais inicialmente colocados para cruzamento, somente dois animais do G1, três do G2, 01 um do G3, um do G4 e dois do G5, ficaram prenhas. Houve nascimentos pré-termo (2 dias antes) em animais do grupo 1, grupo 2 e grupo 5.

A análise da taxa de sobrevivência mostra que após realização do teste de Log-rank (Mantel-Cox), obteve-se um valor de p significativo para ambos os grupos vacinados (G1  $p < 0,05$ ; G2  $p < 0,01$ ), demonstrando que camundongos vacinados com rROP2 e com Fração 3 e Fração Total resistem mais a infecção frente a camundongos não vacinados. As taxas de sobrevivência de acordo com os grupos é apresentada na Figura 1.

As avaliações dos anticorpos IgG, anti rRPO2 estão demonstradas na figura 2. As análises durante todo experimento demonstram que somente no grupo 1 houve aumento significativo do nível dos anticorpos, comparativamente ao grupo 4 que teve ligeiro aumento três dias após a infecção, e o grupo 5 que não teve aumento nos níveis de anticorpos, permanecendo abaixo do *cut-off*, definido como IgG anti rRPO2 = 0,052.

Para análise dos resultados do grupo 2, verifica-se na figura 3 o aumento dos níveis dos anticorpos acima do *cut-off* a partir do dia 56, em relação aos grupos controles 4 e 5. Esta coleta foi realizada durante a gestação das fêmeas. Foi considerado para esta análise o valor do *cut-off* de 0,322.

As análises do G3, G4 e G5 utilizando como antígenos a fração total de proteínas nativas do *T. gondii*, apresentou os níveis de anticorpos acima do ponto de corte (*cut-off*= 0,199) a partir do dia 56.

Após as análises da resposta dos anticorpos IgG anti-*T.gondii*, verificou-se que no grupo 2 e grupo 3 houve resposta para todos os grupos acima do

ponto de corte após o desafio com cepa RH, indicando que as imunizações foram capazes de estimular a resposta imunológica frente aos antígenos. Já na análise do ELISA utilizando proteínas recombinantes ROP2, o grupo 5 apresentou valores abaixo do ponto de corte, mesmo após desafio com cepa virulenta.

Tabela 1. Resultados da avaliação da presença de DNA de *Toxoplasma gondii*, pela técnica de Nested PCR, em macerado de fetos após desafio das fêmeas gestantes com  $10^3$  taquizoítos de cepa RH do *Toxoplasma gondii*.

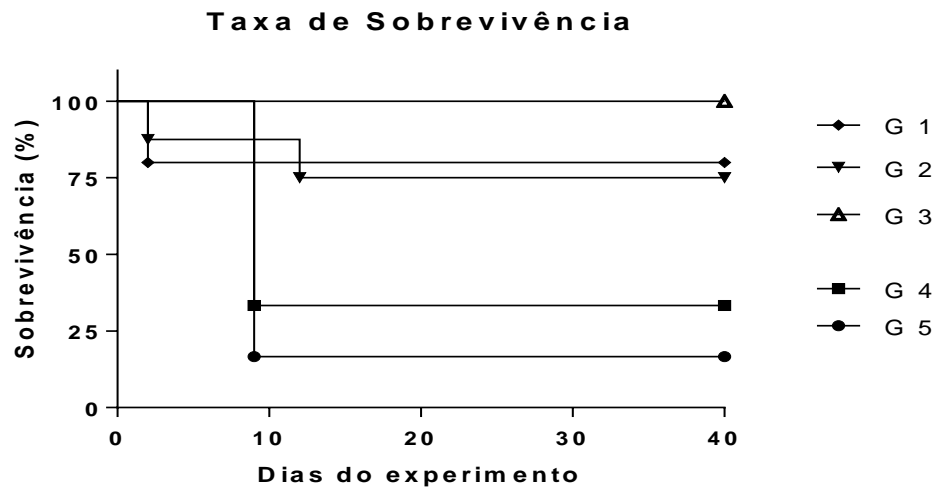
GRUPO (N=15)	N° PRENHAS (média fetos)	TAXA DE PRENHEZ (%)	N° TOTAL FETOS	PCR <i>T.gondii</i>		% TRANSMISSÃO CONGÊNITA	FP
				POS	NEG		
G1	02 (11)	13.3%	11	0	11	0%	100%
G2	03 (3.33)	20%	10	5	5	50%	72%
G3	01 (11)	6.67%	11	0	11	0%	100%
G4	01 (8)	6.67%	8	8	0	100%	2.44%
G5	02 (8.5)	13.3%	17	5	12	29%	Não avaliado

n= número total de animais do grupo

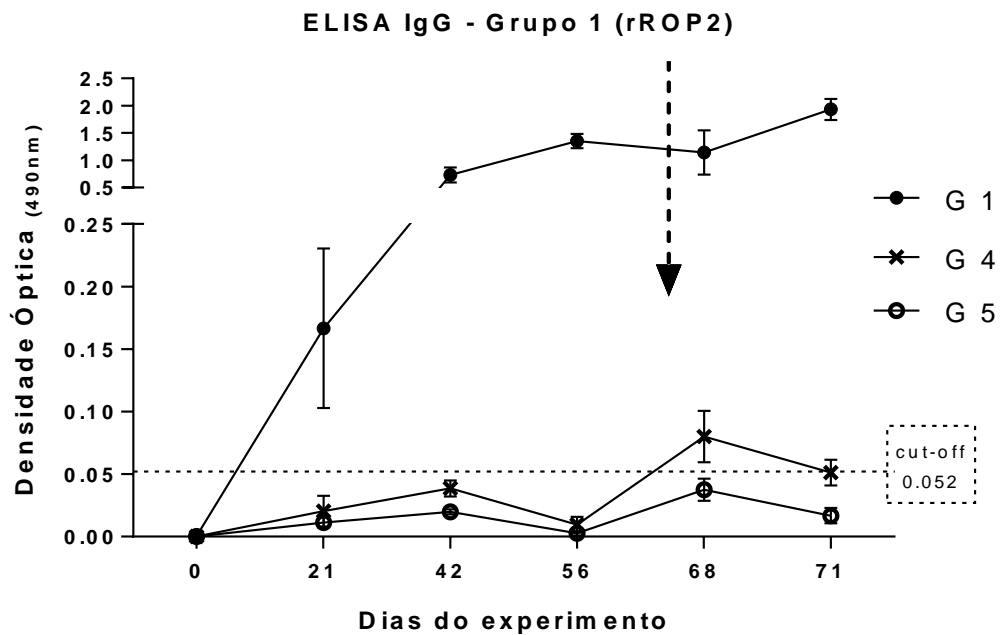
POS - positivos

NEG - negativos

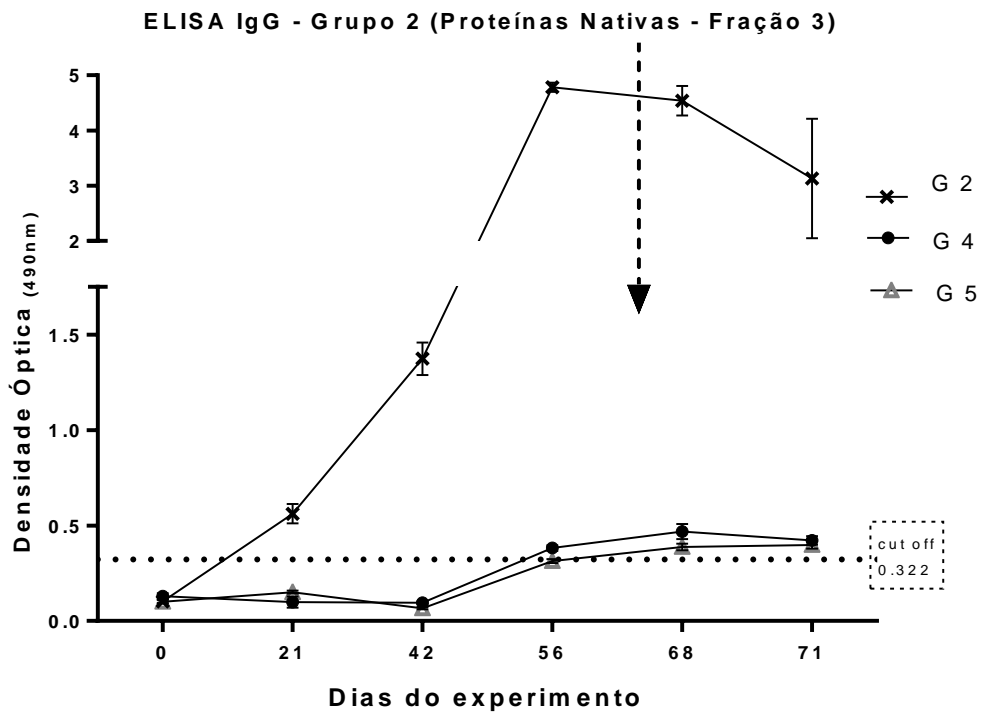
FP- Fração de Proteção



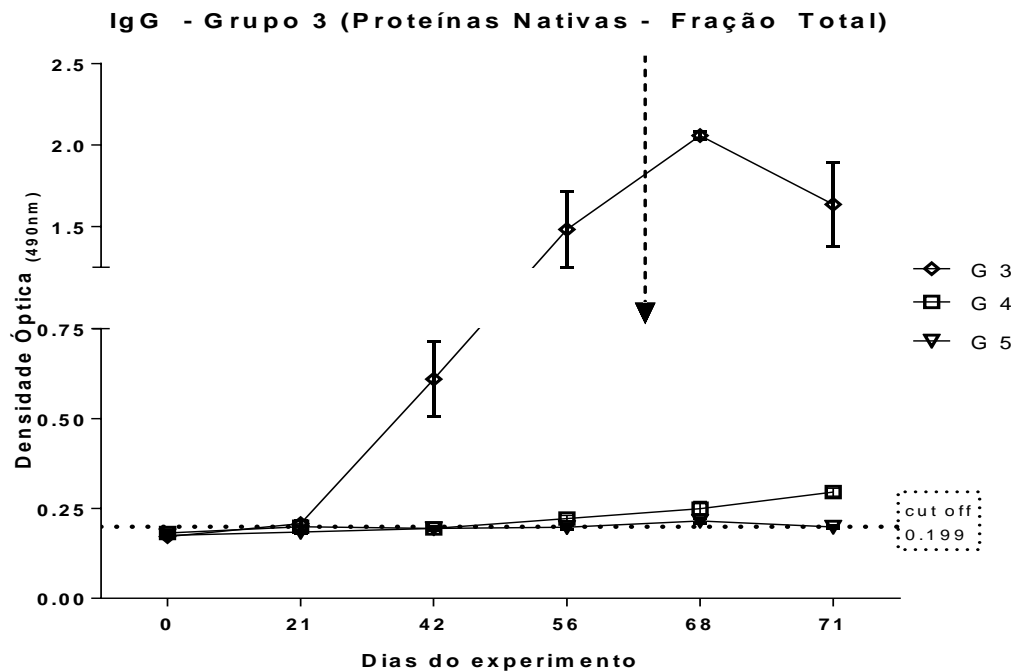
**Figura 1.** Taxas de sobrevivência de animais ao final de 40 dias pós desafio com cepa RH do *T. gondii*.



**Figura 2.** Resposta dos anticorpos anti rROP2 *T. gondii* dos camundongos avaliados pelo ELISA. Imunizações foram realizadas nos dias 0, 21 e 42. A flecha tracejada indica o dia do desafio (dia 65). Todos os grupos foram desafiados com  $10^3$  taquizoítos da cepa RH do *T. gondii*. A linha pontilhada indica o *cut-off*.



**Figura 3.** Resposta dos anticorpos anti roptrias do *T. gondii* dos camundongos avaliados pelo ELISA. Imunizações foram realizadas nos dias 0, 21 e 42. A flecha tracejada indica o dia do desafio (dia 65). Todos os grupos foram desafiados com  $10^3$  taquizoítos da cepa RH do *T. gondii*. A linha pontilhada indica o *cut-off*.



**Figura 4.** Resposta dos anticorpos anti Fração total de roptrias do *T. gondii* dos camundongos avaliados pelo ELISA. Imunizações foram realizadas nos dias 0, 21 e 42. A flecha tracejada indica o dia do desafio (dia 65). Todos os grupos foram desafiados com  $10^3$  taquizoítos da cepa RH do *T. gondii*. A linha pontilhada indica o *cut-off*.

## DISCUSSÃO

O resultados de prevenção da transmissão congênita demonstraram que a imunização com proteínas nativas e recombinantes foi eficaz no que diz respeito a prevenção da infecção no feto. Igarashi et al., (2009) também obteve proteção contra a transmissão congênita do *T. gondii*, em camundongos BALB/c imunizado via intranasal, com rROP2 e desafiados com cepa cistogênica ME49.

Outros estudos, obtiveram proteção parcial (MCLEOD et al., 1988; ROBERTS et al., 1994), porém a comparação entre os estudos é dificultada justamente pela variedade de linhagens, cepas, imunoestimulantes e doses diferentes em cada estudo relacionado a toxoplasmose (GARCIA et al., 2014).

Não foi detectado DNA do parasita nos animais do grupo 1 e grupo 3, no grupo 2 foi detectado em 50% dos animais avaliados bem como em 100% dos animais do grupo 4 e 29% dos animais do grupo 5. Camossi et al. (2014), estudando a infecção de *T. gondii* em ratos, detectou baixa carga parasitária em animais desafiados com cepa RH.

A manipulação humana, contenção física rotineira, qualidade do ar, temperatura e luminosidade são fatores que influenciam diretamente no sucesso dos cruzamentos dos camundongos, no presente estudo obtivemos uma baixa taxa de prenhez nos animais que podem ter sido influenciados por estes fatores (CANTAZARO et al. 1994).

Animais dos grupos 1, 2 e 5 tiveram filhotes que nasceram antes da data prevista para o parto, o que é fato conhecido em gestantes humanas, que quando encontram-se na fase aguda da doença pode ocorrer o parto precoce (DETANICO e BASSO, 2009).

O fator de prevenção das vacinas do presente estudo foram 100% para os grupos 1 e 3 e 72% para o grupo 2. Em um estudo com suínos utilizando proteínas nativas de *T. gondii* como imunizante, Cunha et al. (2012), obteve 41,6% de prevenção no grupo imunizado.

Camundongos vacinados (G1, G2 e G3) permaneceram vivos em maior número que camundongos não vacinados (G4 e G5), porém este resultado não foi estatisticamente significativo. Wang et al., (2009), obtiveram taxa de sobrevivência maior (14%) em camundongos vacinados com vacinas de DNA em relação a camundongos imunizados com um único antígeno ambos desafiados com

cepa RH, na quantidade de  $10^3$  taquizoítos por animal via intraperitoneal, quatro semanas após as imunizações.

Qu et al. (2009) obtiveram proteção parcial e maior taxa de sobrevivência em animais vacinados após desafio com 500 taquizoítos de cepa RH via intraperitoneal em camundongos. Hoseinian et al. (2011), demonstraram proteção parcial em animais infectados com  $10^4$  taquizoítos da cepa RH, resultando em uma maior sobrevivência em animais vacinados comparado aos controles.

Em outro estudo com camundongos da linhagem Kunming imunizados pela via intraperitoneal com taquizoítos irradiados observou-se uma alta taxa de sobrevivência entre 7 e 30 dias, após desafio realizado também com cepa RH na proporção de 100 taquizoítos por animal, neste estudo observou-se que dos animais inicialmente infectados 50% dos animais sobreviveu até o fim do período para análise da taxa de sobrevivência que foi de trinta dias pós infecção (Zhao et al., 2013).

As análises do teste de ELISA, demonstram que os antígenos foram capazes de estimular a resposta imune, pois estes tiveram aumento dos níveis de anticorpos ao longo da vacinação e pós infecção com cepa virulenta.

## CONCLUSÃO

Todas as vacinas testadas foram total ou parcialmente eficazes na prevenção da transmissão vertical da infecção.

A transmissão congênita não foi detectada nos camundongos vacinados com proteínas recombinantes rROP2 e nos vacinados com Fração total de proteínas nativas do *Toxoplasma gondii*, a detecção do DNA do parasita só foi observada no grupo vacinado com proteínas nativas isoladas e nos grupos não vacinados.

O teste de ELISA apresentou aumento nos níveis de anticorpos como resposta aos antígenos vacinais. O teste que utilizou proteínas recombinantes não foi eficaz na comparação com os grupos vacinados após desafio com cepa virulenta. Portanto, mais análises devem ser realizadas para comprovar que esta proteína, apesar de estar presente nos três estágios do parasita, não pode ser utilizada como única ferramenta no diagnóstico de fase aguda.

A análise do resultado da taxa de sobrevivência mostrou um maior número de animais vacinados sobreviveram ao desafio com cepa virulenta de *T. gondii*, porém não houve diferenças estatísticas entre vacinados e não vacinados.

## REFERENCIAS

CAMOSSI LG, FORNAZARI F, RICHINI-PEREIRA VB, DA SILVA RC, CARDIA DF, LANGONI H. Immunization of Wistar female rats with 255-Gy-irradiated *Toxoplasma gondii*: Preventing parasite load and maternofetal transmission. **Experimental Parasitology**, v. 145; p.157–163, 2014.

CUNHA, I. A. L.; ZULPO, D. L.; BOGADO, A. L. G. et al. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 216 – 221, 2012.

CATANZARO, D.; MACNIVEN, E.; GOODISON, T.; RICHARDSON, D. Estrogen antibodies reduce vulnerability to stress-induced failure of intrauterine implantation in inseminated mice. **Physiology Behavior**, v.55, p.35–38; 1994.

DETANICO, L.; BASSO, R. M. C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 15-18, 2006.

DZIADEK, B.; GATKOWSKA, J.; BRZOSTEK, A. DZIADEK J, DZITKO K, GRZYBOWSKI M, DLUGONSKA H. Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis. **Vaccine**, v. 29, n. 4, p. 821–830, 2011.

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**. v. 123, n. 1, p.81–89, 2009.

DZIADEK B, GATKOWSKA J, GRZYBOWSKI M, DZIADEK J, DZITKO K, DLUGONSKA H. *Toxoplasma gondii*: the vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 133–138, 2012.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A., LOPES, A.H.A., SENEFONTE, F.R.A., SOUZA JÚNIOR, V.G., BOTELHO, C.A., FIGUEIREDO, M.S., DUARTE, G. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão e relação entre os testes diagnósticos

materno-fetais em gestantes em Estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 27:442–9.11,2005;.

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

GARCIA, J.L.; INNES, E.A.; KATZER, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Vaccine: Development and Therapy**, v.4, p. 23–37, 2014.

HOSEINIAN KHOSROSHAHI K, GHAFARIFAR F, D'SOUZA S, SHARIFI Z, DALIMI A. Evaluation of the immune response induced by DNA vaccine cocktail expressing complete SAG1 and ROP2 genes against toxoplasmosis. **Vaccine**, v. 29, n.4, p. 778–783, 2011.

HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCIA-PEREZ, A.L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.17–27, 2001.

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., *Toxoplasma gondii*: Produção de Proteína Recombinante rROP2 e avaliação da proteção contra infecção congênita em camundongos. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2009.

IGARASHI, M.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L. et al. *Toxoplasma gondii*: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 246-251, 2010.

INNES E.A., BARTLEY P.M., MALEY S.W., WRIGHT S.E., BUXTON D. Comparative host–parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. **Vaccine**, v.25, p.5495–5503, 2007.

LAGO E.G., CARVALHO R.L., JUNGBLUT R., SILVA V.B., FIORI R.M. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. **Scientia Medica**, 2009;19:27–34.

LOPES F.M., MITSUKA-BREGANÓ R, GONÇALVES DD, FREIRE RL, KARIGYO CJ, WEDY GF, MATSUO T, REICHE EM, MORIMOTO HK, CAPOBIANGO JD, INOUE IT, GARCIA JL, NAVARRO IT. Factors associated with the seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**; 104:378–82.9, 2009.

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 Diagnostic Laboratory Immunology** 5, 627-631, 1998.

MCLEOD R, FRENKEL JK, ESTES RG, MACK DG, EISENHAUER PB, GIBORI G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. **Journal of Immunology**. v.140, n.5, p.1632–1637, 1988.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p.1965-1976, 2004.

NETO E.C., ANELE E., RUBIMA R, BRITESA, A., SCHULTEA, J. BECKRS, D. TUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in 3-year old prospective neonatal screening study. The **International Journal of Epidemiology**; v. 29, p. 941–7.12, 2000.

KENSIL CR, PATEL U, LENNICK M, MARCIANI D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. **Journal of Immunology**, v.146, n. 2, p.431–7, 1991.

PETERSEN E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v.12, n.3, p.214–23, 2007.

QU D, YU H, WANG S, CAI W, DU A. Induction of protective immunity by multiantigenic DNA vaccine delivered in attenuated Salmonella typhimurium against Toxoplasma gondii infection in mice. **Veterinary Parasitology**. n.166, v.3–4, p.220–227, 2009.

RAGHUPATHY, R., Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, p.478–482, 1997.

REICHE EM, MORIMOTO HK, FARIAS GN, HISATSUGU KR, GELLER L, GOMES AC, INOUE HY, RODRIGUES G, MATSUO T. Prevalência da tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmosse, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p.519–27, 2000.

ROBERTS C.W., BREWER J.M., ALEXANDER J. Congenital toxoplasmosis in the balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by Vaccination. **Vaccine** v.12, n.15, p.1389–1394, 1994.

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

SÁNCHEZ V.R., PITKOWSKI MN, FERNÁNDEZ CUPPARI AV, RODRÍGUEZ FM, FENOY IM, FRANK FM, GOLDMAN A, CORRAL RS, MARTIN V. Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 448–453, 2011.

SANTOS FN, BORJA-CABRERA GP, MIYASHIRO LM, GRECHI J, REIS AB, MOREIRA MA, MARTINS FILHO OA, LUVIZOTTO MC, MENZ I, PESSÔA LM, GONÇALVES PR, PALATNIK M, PALATNIK-DE-SOUSA CB. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune((R)) vaccine. **Vaccine** v.. 33, p.6176–90. 2007.

SEGUNDO G.R.S., SILVA D.A.O., MINEO J.R., FERREIRA M.S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil **Journal of Tropical Pediatrics**, v.50: 50–3.13, 2004.

SIEV, D. Estimating vaccine efficacy in prospective studies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 20, p. 279-296, 1994.

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.

SUN HX, XIE Y, YE YP. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine** v.27, n.12, p.1787–96, 2009.

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**, p.38-45, 2000.

WANG H, HE S, YAO Y, CONG H, ZHAO H, LI T, ZHU XQ. *Toxoplasma gondii*: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. **Experimental Parasitology**, v.122, n.3, p.226–232, 2009.

WONG SY, REMINGTON J. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infection Disease** v.18, p.853–62, 1994.

ZHAO Y, HUANG B, HUANG S, ZHENG H, LI YQ, LUN ZR, SHEN J, WANG Y, KASPER LH, LU F. Evaluation of the adjuvant effect of pidotimod on the immune

protection induced by UV-attenuated *Toxoplasma gondii* in mouse models. **Journal of Parasitology Research**, v.112, v.9, p. 3151–3160, 2013.

ZULPO, D. L. ***Toxoplasma gondii* e gatos domésticos: Uso de uma vacina para diminuir a eliminação de oocistos e avaliação da reeliminação.** 2014. 65 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A transmissão congênita do *T. gondii* foi minimizada em animais vacinados via subcutânea com proteína recombinante rROP2, e com proteína nativa (fração total).

Os testes de ELISA utilizando como anígeno frações nativas e recombinantes foi eficaz em detectar os anticorpos contra as proteínas utilizadas como imunógeno.

A taxa de sobrevivência de animais vacinados foi maior comparada aos animais que não foram vacinados, porém, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa.