



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FELIPE MONTEIRO BUGNI

**AÇÃO DA  $\beta$ -GLUCANA EM SUÍNOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM TAQUIZOÍTOS DO  
*Toxoplasma gondii***

---

Londrina  
2008

**FELIPE MONTEIRO BUGNI**

**AÇÃO DA  $\beta$ -GLUCANA EM SUÍNOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM TAQUIZOÍTOS DO  
*Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia  
Co-Orientador: Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro

Londrina  
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

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

B931a Bugni, Felipe Monteiro.

Ação da  $\beta$ -glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii* / Felipe Monteiro Bugni. – Londrina, 2008.

66f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.

Co-orientador: Itamar Teodorico Navarro.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. *Toxoplasma gondii* – Teses. 3. Toxoplasmose em animais – Teses. I. Garcia, João Luis. II. Navarro, Itamar Teodorico. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619:636.4

**FELIPE MONTEIRO BUGNI**

**AÇÃO DA  $\beta$ -GLUCANA EM SUÍNOS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM TAQUIZOÍTOS DO  
*Toxoplasma gondii*.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Luis Garcia  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Odilon Vidotto  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Filho- Jaboticabal

Londrina, 07 de março de 2008.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/ Universidade Estadual de Londrina (UEL), como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia e co-orientação do Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos juntos as agências e órgãos de fomento a pesquisa a baixo relacionados:

- 1. CNPq – Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 2. CPG – Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina**
- 3. CAPES – Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior/ MEC**

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à minha família: meus pais, Virginia e Oberdan e às minhas três irmãs; Vanessa, Renata e Érica e à minha avó Lauda. Também dedico este trabalho à minha namorada Lorena. A força e o incentivo dessas pessoas tornaram possível a conclusão dessa dissertação.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais, Virginia Monteiro Bugni e Oberdan Bugni Junior, por sempre me incentivarem a continuar mesmo nos momentos mais difíceis e acima de tudo por acreditarem em mim desde o começo.**

**À minhas irmãs Vanessa M. Bugni, Renata M. Bugni e Érica M. Bugni, por sempre estarem ao meu lado mesmo estando longe de casa.**

**À minha avó Lauda Nestares Bugni pelas palavras de incentivo e mensagens de otimismo.**

**À minha namorada e sempre companheira Eva Lorena Arantes, por fazer parte da minha vida e por estar sempre ao meu lado nos momentos de dificuldades e alegrias.**

**Aos pais da minha namorada, Aparecido Arantes e Elza B. Arantes, por terem me acolhido, sendo a minha segunda família.**

**Ao meu orientador e amigo João Luis Garcia pelos ensinamentos, ajuda e principalmente pela paciência que teve comigo durante todo o mestrado.**

**Aos professores doutores Italmir Teodorico Navarro e Roberta Lemos Freire, por fazerem parte da minha formação como médico veterinário e compartilharem ensinamentos e experiências valiosas durante o período de convivência acadêmica.**

**Aos professores doutores Rosângela Zacarias Machado e Odilon Vidotto pelas imprescindíveis correções e opiniões sugeridas na defesa e pela participação na banca de mestrado.**

**Às doutorandas Michelle Igarashi e Kátia Tamekuni e à doutora Flora Satiko Kano pela ajuda indispensável no laboratório e principalmente pela amizade.**

**Às doutorandas Mara Cristina Ribeiro da Costa e Graziela Drociunas Pacheco pela amizade e a indispensável ajuda com o manejo dos suínos.**

**Aos meus amigos de faculdade Alexandre N. Tajiri, Bruno B. Ruffolo, André V. Tedim e Kênio F. Munhoz, por sempre poder contar com eles.**

**Aos meus amigos de São Paulo Bruno H. Machado e Gustavo S. Veiga pela amizade de longa data.**

**Aos funcionários do laboratório de zoonoses Ademir J. Silva e Elizabete R. M. Marana por sempre poder contar com a ajuda e amizade.**

**Aos funcionários do laboratório de análises clínicas da UEL e a residente Patrícia F. N. Silva pelos ensinamentos e ajuda.**

**Ao professor Raúl J. H. Castro Gómez por ceder a  $\beta$ -glucana.**

**E aos residentes e todos os estagiários dos laboratórios de protozoologia e zoonoses.**

**Quanto maior a dificuldade, tanto maior o mérito em superá-la.  
(H. W. Beecher)**

BUGNI, Felipe Monteiro. **Ação da  $\beta$ -Glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii***. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que possui capacidade de infectar todos os animais de sangue quente. O suíno é apontado como a principal causa de contaminação de seres humanos pela ingestão de carne crua ou mal cozida. Muitas alternativas podem ser utilizadas na tentativa de prevenir a transmissão deste importante parasita aos suínos, entre elas, está o uso de substâncias imunomoduladoras como a  $\beta$ -glucana, que tem a capacidade de melhorar a resposta do hospedeiro frente a infecções causadas por microorganismos. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação da  $\beta$ -Glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*. Foram utilizados oito suínos (21 dias de idade). Os animais foram divididos em três grupos: G1 ( $\beta$ -glucana e infectados, n=3), G2 (não tratados e infectados, n=3) e G3 (não tratados e não infectados, n=2). Os animais do G1 foram tratados com 1g de  $\beta$ -glucana pela via intramuscular (IM) nos dias 0, 14, e 28 do experimento, enquanto os do G2 e G3 receberam apenas solução salina estéril. Os animais do G1 e G2 foram infectados com taquizoítos ( $10^7$ ) da cepa RH (IM), no 35º dia do experimento. A parasitemia foi determinada por PCR e bioensaio em camundongos a partir do sangue total de cada animal, colhido nos dias 3, 7, 14, 21, 31, 39, 47 e 69 pós-infecção. Os títulos de anticorpos contra *T. gondii* foram obtidos dos suínos pela imunofluorescência indireta (IFI) dos soros, humor aquoso e humor vítreo, considerando positivo um título  $\geq 64$ . Diferenças estatísticas foram observadas na avaliação dos teores de hemoglobina, percentual de hematócrito, valores de proteínas plasmáticas e na contagem de eosinófilos ( $P < 0,05$ ). Os suínos do G1 e G2 soro converteram sete dias pós-infecção, e o maior título encontrado foi de 1024 em dois animais. As amostras de humor aquoso e humor vítreo não revelaram títulos de anticorpos pela IFI. Parasitas no sangue foram detectados nos dias 3, 14, 31, 39 e 47 em dois animais do G1, e em três do G2. Não houve diferenças entre o PCR e o bioensaio. As avaliações das retinas tanto no bioensaio quanto no PCR foram negativas em todos os animais. Os animais do G3 permaneceram negativos durante todo o experimento. O uso da  $\beta$ -glucana, na forma como foi utilizada no presente trabalho, não foi efetiva no controle da infecção aguda contra taquizoítos inoculados pela via intramuscular em suínos. A linhagem da cepa RH mostrou-se não cistogênica para suínos (músculos e retina) 69 dias após a infecção.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*., Cepa RH. Suínos.  $\beta$ -glucana. Bioensaio. PCR.

BUGNI, Felipe Monteiro. **Action of  $\beta$ -glucan in swine experimentally infected with tachyzoites of *Toxoplasma gondii***. 2007. 75p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an intracellular protozoa parasite that infects all warm blood animals. Pork is considered the main transmission source for human beings. Vaccines, immunomodulators, and others therapies could be used for preventing the infection.  $\beta$ -glucan can improve the immune response of the hosts against microorganism infection. The present study tested the action of  $\beta$ -glucan in swine experimentally infected with tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. The experiment design used 8 mixed breed pigs (21 days) divided into three groups: G1 ( $\beta$ -glucan treated and infected, n=3), G2 (untreated and infected, n=3), and G3 (untreated uninfected, n=2). The G1 animals were treated with 1g of  $\beta$ -glucan by intramuscularly route at days 0, 14, and 28 before experimental infection, while the other groups (G2 and G3) received only saline. The G1 and G2 were infected with viable tachyzoites ( $10^7$ ) of the RH strain at day 35 of experiment. The parasitemy was determined by mouse bioassay and PCR from whole blood of each swine, obtained at days 3, 7, 14, 21, 31, 39, 47 e 69 post infections. The antibody levels of serum, aqueous and vitreous humor were measured by indirect immunofluorescence assay (IFA); a title  $\geq 64$  was considered as positive. There were differences in the hematocrit, hemoglobin, plasmatic proteins, and eosinophils values between groups ( $P < 0.05$ ). The swine of G1 and G2 serum converted 7 days post infection, and the highest title observed was 1024 in two pigs. Samples of aqueous and vitreous humor did not show antibodies against *T. gondii*. Parasite was detected of whole blood on days 3, 14, 31, 39, and 47 in two animals from G1, and three animals from G2. There were no differences between PCR and mouse bioassay. The retinas were all negatives in both PCR and bioassay. Animals from G3 remained without parasitemy by both PCR and bioassay throughout the experiment. The use of  $\beta$ -glucana, as was used here, was not protective for pigs against *T. gondii* tachyzoites acute infection. Additionally, the lineage of RH strain showed nonpersistent for pigs (muscles and retina) 69 days after infection.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*., Pigs. RH strain.  $\beta$ -glucan. PCR. Bioassay.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** – Temperatura retal dos suínos dos três grupos experimentais (G1= $\beta$ -glucana + infectado, G2=infectado, G3=controle). Os animais foram infectados com  $10^7$  taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular no dia 0.... 57
- Fig. 2.** – Média dos valores do hemograma obtida semanalmente dos suínos dos três grupos experimentais. As setas pontilhadas indicam a aplicação da  $\beta$ -glucana (G1) e a seta contínua indica o dia da infecção. Os animais (G1 e G2) foram infectados com  $10^7$  taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular. Os animais do G3 eram controle negativo. O  $P \leq 0,05$  indica significância estatística. .... 59
- Fig. 3.** – Média dos valores das contagens diferenciais dos leucócitos obtida semanalmente dos suínos dos três grupos experimentais. As setas pontilhadas indicam a aplicação da  $\beta$ -glucana (G1) e a seta contínua indica o dia da infecção. Os animais (G1 e G2) foram infectados com  $10^7$  taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular. Os animais do G3 eram controle negativo. O  $P \leq 0,05$  indica significância estatística. .... 61
- Fig. 4.** – Média dos valores das dosagens do fibrinogênio e proteína plasmática obtida semanalmente dos suínos dos três grupos experimentais. As setas pontilhadas indicam a aplicação da  $\beta$ -glucana (G1) e a seta contínua indica o dia da infecção. Os animais (G1 e G2) foram infectados com  $10^7$  taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular. Os animais do G3 eram controle negativo. O  $P \leq 0,05$  indica significância estatística. .... 63
- Fig. 5.** – Cinética do título de anticorpos dos suínos dos grupos 1 e 2. Os animais foram infectados com  $10^7$  taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular no dia 0. A linha pontilhada representa o ponto de corte ( $\text{Log}_{10}=1,80$ ). O  $P \leq 0,05$  indica significância estatística. .... 64
- Fig. 6.** – Eletroforese em gel de agarose a 2%, de amostras de taquizoítos diluídos: teste de sensibilidade de 529 pb da PCR. Canaleta 1: Padrão molecular. Canaletas de 2 a 10 representam a diluição:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ,  $10^{-1}$  de taquizoítos/ml, respectivamente. .... 64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Delineamento experimental. ....	53
<b>Tabela 2</b> – Resultado do bioensaio e da PCR, do sangue de suínos, realizado a partir do terceiro dia após o desafio. O desafio dos animais (G1 e G2) foi realizado com $10^7$ taquizoítos da cepa RH, os animais do G3 permaneceram como grupo controle negativo. ....	65

## SUMÁRIO

<b>I REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 TOXOPLASMA GONDII</b> .....	16
2.1 MECANISMOS DE INVASÃO CELULAR .....	17
2.2 RESPOSTA IMUNE.....	18
2.3 EPIDEMIOLOGIA .....	20
2.4. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS EM SUÍNOS .....	22
2.4.1 Cepas RH .....	22
2.4.2 Outras Cepas do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	23
2.5 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS .....	26
<b>3 β-GLUCANA</b> .....	29
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	32
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	33
<b>II OBJETIVOS</b> .....	45
2.1 OBJETIVO GERAL.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>III ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	47
<b>AÇÃO DA β-GLUCANA EM SUÍNOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM TAQUIZOÍTOS DO <i>TOXOPLASMA GONDII</i></b> .....	48
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	50
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
2.1 AMOSTRAS DE T. GONDII .....	52
2.2 PREPARO DA SUSPENSÃO DE TAQUIZOÍTOS DE T. GONDII .....	52
2.3 ANIMAIS .....	52
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	52
2.5 EXTRAÇÃO DA β-GLUCANA .....	53
2.6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO .....	54
2.7 BIOENSAIO.....	54
2.7.1 Avaliação da Parasitemia .....	54

2.7.2 Pesquisa de <i>T. gondii</i> nos Tecidos dos Suínos .....	54
2.8. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) .....	55
2.8.1 Extração do DNA .....	55
2.8.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) .....	55
2.8.3 Sensibilidade da PCR .....	56
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
3.1 SINAIS CLÍNICOS .....	57
3.2 VALORES HEMATOLÓGICOS .....	58
3.3 RESPOSTA IMUNE HUMORAL .....	64
3.4 SENSIBILIDADE DA PCR .....	64
3.5 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA (BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS E PCR) .....	65
3.6 AVALIAÇÃO OCULAR E DIGESTÃO PÉPTICA .....	65
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>IV CONCLUSÕES</b> .....	<b>74</b>

## **REVISÃO DE LITERATURA**

## I REVISÃO DE LITERATURA

### 1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, de distribuição mundial, e que acomete todos os animais de sangue quente (JACOBS e LUNDE, 1957). Aproximadamente 25% da população mundial humana estão cronicamente infectadas pelo *T. gondii* (KHAN et al., 2007).

Normalmente o *T. gondii* parasita o hospedeiro sem causar sinais clínicos (FISHER et al., 1998), porém é capaz de causar uma doença congênita severa em fetos, encefalites em indivíduos imunossuprimidos e alterações oculares em animais e humanos (DUBEY, 1993; DUSQUENE et al., 1991; FISHER et al., 1998; GROSS et al., 1996; JACOBS et al., 1998; KUMOSASI et al., 1996; SILVEIRA et al., 2003).

A disseminação da infecção no ser humano é favorecida pela alta prevalência da infecção em espécies de animais domésticos, principalmente nos suínos e nos ovinos (NAVARRO et al., 1992). O risco de adquirir a infecção através do consumo de carnes cruas ou mal cozidas, fato comum em várias regiões do Brasil, é relatado por Vidotto et al. (1990), Navarro et al., (1992), e Dias et al. (2005). A toxoplasmose tem sido encontrada em várias áreas geográficas do mundo, atingindo aproximadamente um terço da população humana (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000).

*Toxoplasma gondii* é considerado um dos parasitos de melhor adaptação aos seus hospedeiros, que incluem os pássaros, mamíferos marinhos (baleias, leões marinhos e golfinhos), herbívoros e carnívoros terrestres (roedores, animais de caça, animais de produção e o homem), não possuindo restrição geográfica (CARRUTHERS, 2002).

Entre os animais destinados a alimentação humana, suínos, ovinos e caprinos são mais propensos a infecção que equinos e bovinos, sendo que esta última espécie pode reduzir ou eliminar os cistos de *T. gondii* viáveis de seus tecidos (DUBEY, 1993). Os suínos são considerados a principal fonte de infecção da toxoplasmose para o homem nos Estados Unidos (DUBEY, 1994). No Brasil diversos estudos sorológicos para a toxoplasmose, realizados em suínos de diferentes categorias, têm demonstrado prevalências variando de 4% a 37,84% (CARLETTI et al., 2005; FIALHO e ARAUJO, 2003; GARCIA et al., 1999; SUARÉZ-ARANDA et al., 2000; TSUTSUI, et al., 2003 VIDOTTO et al., 1990).

Estes achados caracterizam a criação de suínos como um dos pontos importantes no controle da toxoplasmose humana.

Dentre as formas de prevenção do parasita podemos citar a melhoria nas práticas de manejo dos animais, controle de roedores e felinos, além, da educação sanitária e vacinação. A vacinação dos animais domésticos pode ser uma das estratégias para o controle do *T. gondii*, e tem dois objetivos, ou seja, 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). Outro fator importante na cadeia epidemiológica da toxoplasmose, e talvez o ponto chave no seu controle, é a vacinação de felinos para impedir a eliminação de oocistos pelas fezes (GARCIA et al., 2007). Embora a vacinação seja uma medida importante no controle da toxoplasmose, atualmente, apenas uma vacina (TOXOVAC) é comercializada para uso em ovinos (BUXTON, et al., 1993).

Desta forma, muitas alternativas podem ser utilizadas na tentativa de prevenir a transmissão deste importante parasita. Uma destas seria o uso de substâncias imunomoduladoras, como as  $\beta$ -glucanas, vêm sendo utilizadas, em diversos experimentos, para desenvolver a resposta do hospedeiro frente a infecções causadas por vários microorganismos como bactérias, protozoários, vírus e doenças causadas por fungos (BROWDER et al., 1984; GOLDMAN e JAFFE, 1991; OLIVEIRA et al., 2006 VACHA et al., 1994).

## 2 TOXOPLASMA GONDII

O *T. gondii* é um protozoário classificado dentro do filo Apicomplexa, classe Sporozoazida, subclasse Coccidiasina, ordem Eimeriorina, família Toxoplasmatidae, gênero e espécie *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 1993). Nicolle e Manceaux (1908) e Splendore (1908) foram os primeiros a descrever o parasita. Inicialmente foi descrito como *Leishmania gondii* e posteriormente, em 1909, como *T. gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909).

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

Há três estágios de infecção do *T. gondii*: taquizoítos (livres e em grupos), bradizoítos (cistos em tecidos) e esporozoítos (oocistos) (DUBEY, 1994). O parasita é intracelular obrigatório e possui a capacidade de invadir uma enorme variedade de células nucleadas, tecidos e hospedeiros (CARRUTHERS, 2002). Os gatos domésticos e felídeos selvagens são os únicos hospedeiros definitivos do parasito, sendo os únicos a eliminarem oocistos pelas fezes (FRENKEL et al., 1970). No epitélio intestinal dos felídeos ocorre a fase de esquizogonia. Nessa multiplicação por gametogênese são formados os macrogametas (femininos) e microgametas (masculinos), levando à formação dos oocistos. Os gatos podem eliminar oocistos após a ingestão de taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos (DENKERS, 1993). Porém, menos de 50% dos gatos conseguem eliminar oocistos após a ingestão de taquizoítos ou oocistos comparado à ingestão de bradizoítos (DUBEY e FRENKEL, 1976). Os oocistos são eliminados através das fezes sob a forma não esporulada (não infectante). A esporulação ocorre no meio ambiente entre 1 a 5 dias dependendo das condições de temperatura e umidade (DUBEY et al., 1998).

Hospedeiros intermediários, incluindo os gatos, 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 dos cistos ou dos oocistos e invadem o tecido intestinal, transformam-se em taquizoítos, multiplicam-se localmente e se disseminam por todo o corpo por via sanguínea ou linfática (DUBEY, 1994). Com o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro os taquizoítos encistam 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 hospedeiro intermediário estes cistos podem persistir por toda a vida (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

O *T. gondii* é um microorganismo eucarionte, com uma estrutura formada 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 (DUBEY, 1993; METSIS e PETERSEN, 1995). O *T. gondii* devido as suas características biológicas tais como infecção, multiplicação em grande número de hospedeiros e células tem sido utilizado como importante modelo de estudo biológico do filo Apicomplexa (ROOS et al. 1999).

Com a elucidação do ciclo heteroxeno, o *T. gondii* é considerado a única espécie deste gênero. Porém, estudos de epidemiologia molecular, diferenciaram três linhagens clonais, tipo I, II, III (HOWE e SIBLEY, 1995), e tem-se discutido se estas diferenças indicariam espécies diferentes (TENTER et al., 2000).

## 2.1 MECANISMOS DE INVASÃO CELULAR

Todos os parasitas coccidianos após entrada colidem ao acaso com as células do hospedeiro e a penetração somente ocorre após reorientação da porção anterior do parasita com a superfície da célula parasitada (PERKINS, 1992).

Dentre os mecanismos que permitem a entrada do parasita na célula do hospedeiro estão os movimentos de contração do conóide e as secreções liberadas pelas organelas presentes no complexo apical (micronemas, roptrias e grânulos densos). A invasão celular pode ocorrer de forma ativa ou por fagocitose (NICHOLS e CHIAPPINO, 1987; PACHECO SOARES e DE SOUZA, 2000; SETHI e PIEKARSKI, 1987).

A invasão da célula pelo taquizoíto é extremamente rápida, cerca de 15 a 40 segundos (MORISAKI et al., 1995; SAFFER e SCHWARTZMAN, 1991), e sofre influências da concentração de íons extracelulares, da motilidade do taquizoíto e de produtos secretados (McLEOD, et al., 1991). O processo de invasão celular do *T. gondii* é extremamente complexo e altamente coordenado, interferindo na sobrevivência do parasita na célula do hospedeiro

(CARRUTHERS e SIBLEY, 1997; DUBREMETZ e SCHWARTZMAN, 1993; SAFFER et al., 1992).

Depois do reconhecimento e junção da porção anterior do parasita na membrana da célula do hospedeiro, formando uma área de adesão bastante firme, ocorre a protusão do conóide e a secreção ordenada das organelas do parasita (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997), que irão facilitar a penetração para o interior da célula com a formação de um vacúolo parasitóforo (VP) que não é acidificado e tão pouco se une ao lisossomo, permitindo ao parasita a sua multiplicação no interior desse vacúolo (BONHOMME et al., 1990; LECORDIER et al., 1999; SADAK et al., 1988).

Os mecanismos pelos quais o parasita evita a sua destruição no VP ainda não estão totalmente esclarecidos (CAMUS et al., 1995). Sabe-se, que o parasita impede a acidificação do VP durante a sua formação (explosão aeróbica). E que as modificações que ocorrem na membrana do VP decorrentes de proteínas do parasita, impedem a fusão com o lisossomo (COPPENS et al., 1999; KIMATA e TANABE, 1987).

É possível que as modificações ocorridas na membrana do VP, que impedem a fusão com o lisossomo, possam também impedir a acidificação do VP, e isto pode estar associado à exclusão ou inativação de bombas de proteínas ou canais de íons da membrana plasmática (McLEOD et al., 1991). Com o advento da resposta imune os taquizoítos formam os bradizoítos, enquanto o VP da origem ao cisto tecidual (CAMUS et al., 1995). Os bradizoítos, dentro dos cistos teciduais, podem persistir por toda vida do hospedeiro e, reconversões ao estágio de taquizoítos podem ocorrer em pacientes imunodeprimidos (LANZER et al., 1997).

## **2.2 RESPOSTA IMUNE**

A resposta do hospedeiro ao *T. gondii* está relacionada à 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 um esta associada à virulência na fase aguda em camundongos, a linhagem tipo dois na indução da fase crônica e a linhagem tipo três é a menos virulenta (ALEXANDER e HUNTER, 1998).

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. Onde os animais jovens, nas diferentes espécies, apresentam-se mais susceptíveis a infecção (DUBEY, 1993).

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 específico na presença de complemento bem como citotoxicidade celular dependente de anticorpos podem lisar os parasitas extracelulares, bloqueando 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).

Isoladamente a resposta humoral não é suficiente para promover proteção no hospedeiro, provavelmente devido à localização intracelular do parasita. Vários autores têm demonstrado a importância da resposta celular na imunidade do agente (BUXTON, 1993; FRENKEL, 1990; SHER e COFFMAN, 1992).

A principal porta de entrada do *T. gondii* é a via oral, sendo que nos herbívoros os oocistos são a principal forma de infecção. Portanto a imunidade local conferida pelos linfócitos (principalmente linfócitos intra-epiteliais que apresentam atividade CD8) e IgA são de fundamental importância na proteção contra o parasita (BOURGUIN et al. 1993; VELGE-ROUSSEL et al., 2000).

A imunidade protetora é essencialmente associada com respostas do tipo Th1, o principal efeito está associado à proliferação de linfócitos T e produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (GAZZINELLI et al., 1993). Porém, respostas imunes moderadas de Th2, também podem ser benéficas para o controle de fenômenos imunopatológicos de excesso de reações inflamatórias e de Th1 (GAZZINELLI et al., 1996). Estão envolvidas ainda células exterminadoras naturais (EN) produtoras de INF- $\gamma$ , que são importantes para a resistência na fase aguda da infecção e para direcionar a resposta imune adquirida (DENKERS, 1993).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

Os suínos são considerados a principal fonte de infecção da toxoplasmose para o homem nos Estados Unidos (DUBEY, 1994). A ocorrência e a distribuição do *T. gondii* têm sido relacionada com as condições climáticas e influenciada pela temperatura, chuva e umidade. A idade do animal, a raça, as condições ambientais e o manejo em geral, são os determinantes principais da prevalência de anticorpos contra *T. gondii* (ARKO-MENSAH et al., 2000). A transmissão do *T. gondii* para os suínos ocorre primeiramente pela ingestão de água, alimento e solo contaminado com oocistos eliminados pelas fezes dos gatos e pela ingestão de tecidos contendo cistos do parasita. Gatos jovens têm sido apontados como a fonte primária de transmissão do *T. gondii* para o suíno (MATEUS-PINILLA et al., 1999).

A toxoplasmose natural em suínos foi diagnosticada pela primeira vez nos Estados Unidos por Farrel et al. (1952), em um rebanho que apresentava elevada mortalidade em todas as faixas etárias.

Após esse achado, estudos sorológicos têm demonstrado a alta disseminação do *T. gondii*, na Europa e EUA, particularmente em suínos, ovinos e caprinos (TENTER et al., 2000). Em uma investigação epidemiológica realizada nos EUA, anticorpos contra *T.gondii* foram encontrados pela Técnica de Aglutinação Modificada (MAT) em 23% de 11229 suínos de terminação e 42% de 613 porcos adultos abatidos para consumo nos anos de 1983 a 1984 (DUBEY et al., 1991). Ainda nos EUA, Dubey, et al. (1995) estudaram porcas reprodutoras e detectaram 22,2% de animais positivas pelo MAT. Na Argentina um estudo realizado em 109 suínos provenientes de um abatedouro em La Plata revelou uma prevalência pela Imunofluorescência Indireta (IFI) de aproximadamente 40% (OMATA et al., 1994). Mais recentemente, um estudo de soroprevalência nacional realizado em Gana com 641 suínos revelou que 39% dos animais pesquisados eram positivos no teste de ELIZA (ARKO-MENSAH et al., 2000). Nesse estudo a prevalência de anticorpos anti *T. gondii* foi mais elevada nos animais de faixa etária maior.

No Brasil, diversos estudos sorológicos realizados em suínos de diferentes categorias, demonstraram uma grande variação da prevalência da toxoplasmose, sendo de 4% (CARLETTI et al., 2005), 9,6% (SUARÉZ-ARANDA et al., 2000), 15,35% (TSUTSUI, et al., 2003), 24% (GARCIA et al., 1999), 33,75% (FIALHO e ARAUJO 2003) e 37,84% (VIDOTTO et al., 1990). Esta grande variação pode ser relatada pela diferença de fatores regional-geográficos dos diversos sistemas de produção no país (GARCIA et al., 1999).

A grande produção e consumo da carne suína, aliada a alta disseminação e prevalência do *T. gondii*, associada ainda ao fato de que os cistos podem permanecer viáveis na musculatura dos suínos infectados por até 875 dias (DUBEY, 1988) e não serem detectáveis na inspeção no momento do abate (KOSKI, 1990), torna este alimento potencialmente de risco na transmissão da toxoplasmose ao homem, quando for ingerido cru ou mal cozido.

Um estudo realizado no município de Londrina ressalta a importância da carne suína como transmissora do *T. gondii*, neste trabalho Navarro et al. (1992) avaliaram 117 amostras de carne suína comercializada em açougues e verificaram, através do bioensaio em camundongos, 19,66% amostras positivas. Da mesma forma, Dias et al. (2005) analisaram 149 amostras de lingüiças frescas obtidas de oito fábricas da região de Londrina. Após o bioensaio em camundongos, 13 (8.7%) amostras de lingüiça foram positivas, sendo que em uma delas foi possível o isolamento do *T. gondii*. Em um outro estudo, 33 de 70 amostras de lingüiças frescas obtidas de estabelecimentos comerciais no município de Botucatu (SP), foram positivas pela técnica de PCR (MENDONÇA, 2003). Gilbert et al. (2000) estimaram que 2/3 de todos os casos de toxoplasmose são causados por ingestão de carne infectada. Por este motivo o controle da toxoplasmose suína assume um importante papel na cadeia epidemiológica (DUBEY et al., 1994).

Embora muito desejável para a interrupção da cadeia de transmissão, não existe, até o momento, formas para realizar a inspeção dos suínos para o *T. gondii*, pois, não é possível a detecção dos cistos teciduais por visualização. Os testes disponíveis para a detecção da doença em suínos, como o bioensaio e os exames sorológicos, não são aplicáveis para a inspeção em frigoríficos.

Atualmente, existem pesquisas para a utilização da PCR em tempo real para averiguar a positividade de animais para a presença de cistos teciduais (JAUREGUI et al., 2001). Porém, este seria um método caro e detectaria apenas o DNA do parasita. Portanto, com o uso dos testes sorológicos é possível determinar a prevalência da infecção por propriedade, rebanho ou região. Bem como, usá-los como ferramenta de estudos epidemiológicos. Desta maneira, a avaliação da taxa de infecção unida com os esforços para reduzir a infecção pelo aprimoramento do manejo na propriedade, seria uma das medidas para reduzir o potencial risco do consumo de carne suína contaminada com *T. gondii* (GAMBLE et al., 2005).

## 2.4 INFECÇÕES EXPERIMENTAIS EM SUÍNOS

### 2.4.1 Cepa RH

A cepa RH é o isolado de *T. gondii* mais comumente utilizada e estudada em laboratórios. Muito do conhecimento sobre a biologia desse parasita foi determinado pela caracterização da cepa RH (HOWE e SIBLEY, 1994). Esta cepa foi isolada em 1939 por Sabin, (1941) de um caso de encefalite congênita fatal causada pelo *Toxoplasma gondii*. Desde então, ela vem sendo propagada em cultivo celular e em camundongos em vários laboratórios.

Há diferenças entre linhagens da cepa RH de diferentes laboratórios, sendo que essa variação de linhagem se deve a diferenças genéticas causadas, provavelmente, pelos 50 anos de cultivo e passagens em camundongos (HOWE e SIBLEY, 1994).

Algumas cepas RH podem causar toxoplasmose severa em suínos enquanto outras não (DUBEY et al., 1994). A cepa RH tem sido descrita como não persistente nos tecidos de suínos, por mais que 64 dias, e inclusive indicada como uma alternativa vacinal para os mesmos (DUBEY et al., 1991; WORK et al., 1970). Porém, Pinckney et al. (1994) recuperaram a cepa RH dos tecidos de suínos infectados experimentalmente pela via intravenosa.

Além das diferenças genéticas entre as cepas RH, a via de inoculação pode influenciar na patogenicidade causada ao animal. Cistos de *T. gondii* não foram demonstrados em suínos aos 42 e 64 dpi com a cepa RH inoculada tanto pela via subcutânea, como pela intramuscular (DUBEY et al., 1991). Estes autores não verificaram sinais clínicos a não ser febre com infecção de  $10^6$  taquizoítos da cepa RH. Da mesma forma, Garcia et al. (2005) não verificaram sinais clínicos em leitões infectados pela via intramuscular com  $7 \times 10^7$  taquizoítos da cepa RH. Dubey et al. (1994) inocularam suínos com  $10^5$  taquizoítos da cepa RH pela via intramuscular e intravenosa. Os animais inoculados pela via intramuscular somente apresentaram febre, já os animais inoculados pela via intravenosa adoeceram e/ou morreram.

Apesar da cepa RH não se apresentar como persistentes em tecidos de suínos foram encontradas lesões no fígado (4 a 14 dias PI) dos animais inoculados, indicando que esse órgão pode ser um local de multiplicação e/ou eliminação do *T. gondii* (DUBEY et

al., 1994). Pinckney et al. (1994) verificaram conjuntivite, ulcerações e corioretinite oculares em suínos após 7, 9, 14 e até mesmo 60 dias após a infecção pela via intravenosa com a cepa RH. Freire et al. (2003) verificaram, pelo bioensaio em camundongos, uma de nove amostras positivas após a inoculação de cérebro dos suínos em camundongos. Esses suínos foram inoculados com  $10^5$  e  $10^7$  taquizoítos da cepa RH pela via IM em um intervalo de 34 dias e eutanasiados com mais de 110 dias da primeira inoculação.

Portanto a dose, a via de inoculação e a cepa de *T. gondii*, além da raça e idade dos suínos devem ser levadas em consideração em estudos experimentais (JUNGERSEN et al., 1999).

#### **2.4.2 Outras Cepas do *Toxoplasma gondii***

Alguns trabalhos de infecção experimental com o *T. gondii* em suínos têm sido realizados com diferentes objetivos, principalmente, avaliar a virulência das amostras, distribuição de cistos nos tecidos e proteção contra desafio experimental em animais vacinados.

Dubey et al. (1986) inocularam dois suínos com a cepa GT-1 (isolada de caprinos), com o objetivo de avaliar a distribuição de cistos em cortes comerciais de suínos. Os animais foram inoculados com  $10^4$  oocistos da cepa GT-1 e posteriormente (267 e 357 dias após a inoculação) avaliados com relação à presença do parasita em cortes comerciais e órgãos pela prova de bioensaio em camundongos. *T. gondii* foi isolado dos seguintes cortes de carne: paleta, pernil, costela e bacon, bem como, língua, diafragma, coração, cérebro e rim. Os camundongos inoculados com os tecidos desses suínos morreram de toxoplasmose aguda, caracterizando essa cepa como patogênica em camundongos e capaz da formação de cistos teciduais em suínos inoculados com oocistos.

Vidotto et al. (1987a) inocularam  $10^4$  oocistos da cepa AS-28 em porcas gestantes e encontraram sinais clínicos como hipertermia, anorexia, corrimento nasal, taquipnéia, lacrimejamento, prostração e abortamento a partir do 4º dia após a infecção. As porcas na primeira metade da gestação foram mais susceptíveis ao *T. gondii*. Vidotto e Costa (1987) determinaram a parasitemia dessas porcas pelo bioensaio em camundongos e encontraram o parasita no sangue do terceiro dia até o nono dia após a infecção. Os autores

descreveram lesões em vários órgãos dos fetos e leitões, tais como; cérebro, fígado, pulmão, rim, coração e musculatura esquelética.

Em outro experimento Dubey, (1988) relatou que tecidos suínos, principalmente língua e coração, podem permanecer infectados com *T. gondii* por mais de 875 dias. Esse resultado foi obtido após a inoculação de 16 animais com  $10^3$  oocistos de quatro diferentes cepas de *T. gondii*: GT-1, Me-49 (isolada de ovinos), TS-2 (isolada de cordeiro abortado), TC-2 (isolada de gato). Outro dado relatado no estudo foi que o número de cistos teciduais encontrados nos suínos era baixo, além de se apresentarem desigualmente distribuído pelo animal.

Dubey et al. (1991) após vacinar suínos com a cepa RH fez um desafio com oocistos provenientes de uma mistura de dez cepas de *T. gondii*. Os animais do grupo controle, que não foram vacinados, também foram desafiados pela via oral com os oocistos, nas doses de  $10^4$  e  $10^5$ . No período de três a oito dias após o desafio com os oocistos, esses animais passaram a apresentar febre, diarreia e anorexia. Um animal que recebeu a dose de  $10^5$  ficou muito doente e teve de ser eutanasiado nove dias após o desafio. O *T. gondii* foi isolado de tecidos como língua, coração e cérebro desses suínos pelo bioensaio em camundongos, 42 dias após o desafio.

Bekner da Silva et al. (1994) infectaram suínos pela via intravenosa (IV) e não observaram sinais clínicos além de hipertermia. Estes autores utilizaram  $10^6$  taquizoítos vivos das cepas RH (isolada de seres humanos), LIV-4 e LIV-5 (isoladas de suínos), CPL-I (isolada de caprinos) e HV-III (isolada de cão). Isso reforça a idéia de que a virulência não é um fator intrínseco ao parasita, mas é dependente da interação parasita hospedeiro. Essas divergências observadas na virulência das cepas de *T. gondii* para diferentes hospedeiros são um indicativo de que outros parâmetros genéticos, além daqueles descritos por Howe e Sibley et al. (1995), determinam a patogenicidade para um dado hospedeiro (JUNGERSEN et al., 1999).

Um estudo realizado com a cepa mutante TS-4 (termo sensível) revelou que suínos inoculados, tanto pela via IV como pela via SC, com  $3 \times 10^5$  taquizoítos vivos não desenvolveram sinais clínicos da doença e a cepa TS-4 não foi isolada dos tecidos dos animais infectados. Os animais apresentaram baixos títulos de anticorpos pelo MAT em ambas as vias de inoculação. Além disto, os autores relataram que a idade não é um fator de suscetibilidade para suínos inoculados com a cepa TS-4, pois os animais do estudo foram inoculados aos três dias de idade. No mesmo experimento esses animais foram submetidos a um desafio com  $8 \times 10^4$  oocistos da cepa GT-1. Os autores verificaram que a cepa TS-4 não previne a formação de

cistos teciduais em suínos, porém pode diminuir o número de cistos teciduais nos animais inoculados pela via SC e proteger contra a doença clínica. Para o uso como uma vacina viva a cepa TS-4 se mostrou segura, sem distribuição tecidual e não persistente (PINCKNEY et al. 1994).

Jungersen et al. (1999) demonstraram que uma dose moderada da cepa NED (isolado de humano com toxoplasmose congênita) aparentou não ser mais virulenta para os animais que as outras duas cepas originárias de suínos (SSI 119 e P14) ou a outra cepa isolada de tecido cardíaco de uma raposa (Fox2). Entretanto a cepa isolada de um aborto de ovelha (O14) demonstrou respostas menores em relação aos parâmetros avaliados na caracterização da virulência do *T. gondii*. Esse experimento foi realizado com a inoculação de  $10^4$  taquizoítos destas cinco cepas em suínos jovens (6 a 7 semanas) pela via intravenosa para verificar a virulência. Todos os suínos, com exceção do grupo que recebeu a O14, apresentaram um pequeno aumento de temperatura nos dias seis a oito pós-inoculação (PI). Outro grupo de suínos que receberam uma dose de  $10^6$  taquizoítos da cepa SSI 119, tornaram-se clinicamente doentes e com febre aos quatro dias PI, com a morte de um suíno ao sexto dia PI e variações de temperatura até o 17<sup>th</sup> dia PI.

Outros parâmetros também foram avaliados (JUNGERSEN et al., 1999), ou seja, anticorpos IgG contra *T. gondii* foram detectados pelo ELISA à partir do décimo dia PI em suínos inoculados com a dose de  $10^6$  taquizoítos da cepa SSI 119, enquanto que os animais inoculados com a dose de  $10^4$  taquizoítos das outras cepas não apresentaram resposta até o dia 14 a 17 dia PI. Com relação a dosagem de haptoglobina sérica somente os animais inoculados com a cepa NED e O14 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Já os níveis de FA no soro sanguíneo apresentaram uma significativa redução do dia seis aos 14 PI em todos os suínos, exceto nos animais do grupo inoculado com a cepa O14 e o grupo controle.

Em outro estudo realizado por Freire et al. (2003), com o objetivo de avaliar a proteção contra *T. gondii* em suínos desafiados com oocistos, foram utilizadas duas cepas LIV-5 (isolada de suínos) e AS-28 (cepa cistogênica isolada de camundongos). Os resultados demonstraram que os animais vacinados com antígenos de superfície da cepa LIV-5 incorporados ao iscom (complexo imunoestimulante) foram protegidos contra um desafio de  $5 \times 10^4$  oocistos da cepa AS-28. Os animais do grupo não vacinado e desafiados com a cepa AS-28 demonstraram sinais clínicos da doença incluindo hipertermia e prostração. O resultado do bioensaio desses animais foi positivo em amostras de coração e retina de dois dos

nove suínos infectados. A soroconversão (IFI) de todos os animais vacinados somente ocorreu após o desafio com os oocistos da cepa AS-28.

Também com o objetivo de avaliar a proteção contra a formação de cistos teciduais Garcia et al. (2005) vacinaram suínos com oocistos do *T. gondii* incorporados ao iscom. Após o desafio com  $4 \times 10^4$  oocistos da cepa VEG verificaram uma proteção parcial, ou seja, uma menor produção de cistos teciduais nos animais vacinados quando comparados aos animais controle. Os animais inoculados com a cepa VEG apresentaram sinais clínicos dos quatro aos sete dias após a inoculação, inicialmente com secreção ocular seguida de tosse, anorexia, prostração e febre alta. Esses animais se recuperaram oito dias após a inoculação e a maioria das amostras de tecidos musculares e cérebro foram positivas no bioensaio em camundongos.

Mais recentemente Tsutsui et al. (2007) verificaram a distribuição de cistos teciduais em cortes comerciais de suínos inoculados com  $4 \times 10^4$  oocistos da cepa VEG. Os resultados foram avaliados pelo bioensaio em camundongos e pela PCR. Todos os cortes comerciais avaliados (pernil, lombo, costela e paleta) foram positivos por um dos dois métodos. Entretanto não foram observadas diferenças significativas na detecção do *T. gondii* entre os tipos de cortes comerciais que foram avaliados pelo bioensaio, que se mostrou como melhor técnica de diagnóstico quando comparado a PCR.

As diferenças observadas na patogenicidade das várias cepas de *T. gondii* indicam que a virulência das cepas pode variar muito em relação ao agrupamento delas por tipos, feito por técnicas biomoleculares. Essas diferenças podem estar relacionadas com a adaptação ao hospedeiro ou mais ligadas a modificações inerentes ao potencial proliferativo das cepas em meios de cultura (JUNGERSEN et al., 1999).

## **2.5 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS**

O diagnóstico da toxoplasmose em suínos é baseado, principalmente, no diagnóstico direto do parasita ou indiretamente pela detecção de anticorpos pelos testes sorológicos. O diagnóstico direto pode ser realizado pelo bioensaio em animais (principalmente em camundongos e gatos), sendo este o principal método usado para detectar cistos teciduais. O bioensaio em gatos possui alta sensibilidade, além de ser considerado o padrão ouro para detecção do *T. gondii* (DUBEY e FRENKEL, 1976). Entretanto possuem as

desvantagens de apresentarem riscos ao executor, serem trabalhosos e caros (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma eficiente técnica molecular que detecta o parasite em diversos fluidos corporais, tecidos e sangue, tanto dos animais como do homem. Esse método possui boa sensibilidade, alta especificidade e é uma técnica que pode ser realizada rapidamente (CHABBERT et al., 2004; YAI et al., 2003). Jauregui et al. (2001) desenvolveram um teste real-time PCR para detectar *T. gondii* em tecidos de suínos e sugerem que essa técnica pode complementar ou até substituir as técnicas de bioensaio e testes sorológicos. Porém, Garcia et al. (2006) encontraram um melhor desempenho do bioensaio em camundongos na detecção de *T. gondii* em tecidos de suínos quando comparados com a técnica de PCR.

As técnicas de diagnóstico direto por histopatologia (HE) não são eficientes para detectar cistos de *T. gondii* em amostras de tecidos (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; GARCIA et al., 2006; YAI et al., 2003). Isto pode ser explicado pelo fato de suínos apresentarem menos de um cisto por 50g de tecido (DUBEY, 1988). A imunoistoquímica é um método histopatológico utilizado principalmente na fase aguda da infecção para detecção de taquizoítos nos tecidos (DUBEY, 1994).

A presença de anticorpos anti *T. gondii* está associada com a presença do parasita viável no organismo, como na carne ou outros órgãos do suíno (ANDREWS et al., 1997).

Vários testes sorológicos, cada um com suas particularidades, podem ser utilizados para a detecção de anticorpos, tais como, Sabin-Feldman (SF) ou dye test, IFI, aglutinação em látex (LA), teste de hemaglutinação indireta (IHAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), e o teste aglutinação modificada (MAT) (KOSKI, 1990, MONTOYA e LIESENFELD, 2004). O ELISA e a IFI são testes capazes de distinguir a IgG e a IgM, enquanto o MAT, não possui essa característica. Entretanto a produção de IgM em suínos é pouco duradoura, portanto não sendo um bom método para avaliar o tempo de infecção (LIND et al., 1997). O SF é de difícil aplicação e de certo risco biológico, devido ao uso de taquizoítos vivos como antígeno, além de ser pouco usado no sorodiagnóstico de animais. O MAT apresentou boa especificidade quando comparado com soros de suínos infectados experimentalmente com vírus, helmintos e protozoários como o *Nesopora caninum* e o *Sarcocystis miescheriana* (DUBEY, 1997).

Quando comparado com os outros testes sorológicos o teste de ELISA apresenta algumas vantagens, como, a leitura dos resultados não ser de caráter subjetivo, ser

mais apropriado para uso em larga escala, e ser mais barato que o MAT (DUBEY et al., 1995). Além disto, o ELISA indireto apresentou melhor desempenho que o MAT, na detecção de anticorpos contra *T.gondii* no soro de suínos infectados natural e experimentalmente (GAMBLE et al., 2005; HILL et al., 2006). Entretanto, a reação cruzada, resultando em falsos positivos, é um dos problemas mais importantes quando antígenos solúveis totais de *T. gondii* são usados nos exames de ELISA indiretos (ANDREWS et al., 1997).

A IFI detecta anticorpos que aparecem no início da infecção, por meio do reconhecimento de antígenos de superfície da membrana intacta dos taquizoítos. Enquanto os anticorpos no ELISA são detectados mais tardiamente durante o curso da infecção (KOSKI, 1990).

### 3 $\beta$ -GLUCANA

As  $\beta$ -glucanas estão entre os principais componentes da parede celular das leveduras, e possuem atividades imunomoduladoras (OLIVEIRA et al., 2006). Também podem ser encontradas em vegetais e algumas bactérias; mas não são encontradas nos animais, sendo dessa maneira, reconhecidas pelo sistema imune inato dos vertebrados (BROWN e GORDON, 2003). São polissacarídeos com função estrutural na parede celular do fungo (CAMELINI, et al., 2005). A estrutura química dessas macromoléculas é um fator fundamental para sua atividade sobre o sistema imune; constituindo-se de uma cadeia principal com unidades de  $\beta$ -glucopiranosose, com ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3), e ramificações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) variadas e de diversos comprimentos (BROWN e GORDON, 2003). O interesse por essas moléculas deu-se a partir de estudos que comprovaram atividade estimulatória do sistema imune com o zymosan, que dentre os seus diversos componentes, possui a glucana como seu componente biológico mais ativo (FITZPATRICK e DICARLO, 1964).

A extração da  $\beta$ -glucana de leveduras é decorrente da suspensão de partículas de  $\beta$  $\rightarrow$ 1,3 polissacarídeos (DI LUZIO et al., 1979). As glucanas com essas características podem determinar resistência do hospedeiro frente a infecções causadas por microorganismos como bactérias, protozoários, vírus e doenças causadas por fungos (BROWDER et al., 1984; GOLDMAN e JAFFE, 1991; OLIVEIRA et al., 2006; VACHA et al., 1994). Além dessas atividades biológicas as  $\beta$ -glucanas, presentes na parede celular dos fungos, também possuem atividades antitumorais e efeitos pró-vasculogênicos, sendo este relacionado com a atividade imunomodulatória e hematopoiética das  $\beta$ -glucanas (CAMELINI, et al., 2005).

A atividade das  $\beta$ -glucanas in vitro tem sido descrita como ativadoras diretas de leucócitos, estimulando fagocitose, citotoxicidade e atividades antimicrobiológicas (BROWN e GORDON, 2003). Entretanto, as  $\beta$ -glucanas podem apresentar atividades supressoras da produção de citocinas pró-inflamatórias, quando expostas a uma resposta secundária (NAKAGAWA et al., 2003). Esses efeitos podem estar relacionados com o elevado tempo de permanência no organismo, pois as  $\beta$ -glucanas podem permanecer por várias semanas no organismo (SUDA et al. 1996).

O reconhecimento das  $\beta$ -glucanas solúveis pelo sistema imune dos vertebrados ocorre exclusivamente por receptores de superfície celular e a sua opsonização

contribui para o reconhecimento de glucanas particuladas. Os leucócitos que possuem atividades de receptores para as  $\beta$ -glucanas são os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células exterminadoras naturais (EN), além de outras células não pertencentes ao sistema imune, tais como: células endoteliais, do epitélio alveolar e fibroblastos (BROWN e GORDON, 2003). Os receptores celulares de  $\beta$ -glucanas CR3 e dectin-1 possuem as seguintes funções: os CR3 estimulam a secreção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e interleucina-6 (IL-6) em células EN, principalmente na presença de patógenos (ROSS et al., 1999); e o dectin-1 possui ligante co-estimulatório para células T e polissacarídeos exógenos em monócitos e macrófagos, além de reconhecer  $\beta$ -glucanas com estruturas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (BROWN e GORDON; 2001, 2003).

Como os efeitos estimulatórios das  $\beta$ -glucanas, tanto no sistema imune específico como no não específico, vêm sendo demonstrado em mamíferos (WILLIAMS et al., 1989; SUZUKI et al., 1990), vários estudos foram realizados para testar o uso da  $\beta$ -glucana nas criações animais. Hiss e Sauerwein (2003) administraram a  $\beta$ -glucana derivada do *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação de suínos desmamados, e avaliaram o seu crescimento e as respostas imunes, específica e não específica. Os animais, após quatro semanas de experimento, não apresentaram melhora no desempenho de crescimento quando comparados com o grupo controle, além de não ser evidenciado efeito sobre o sistema imune inato por meio da dosagem de haptoglobinas séricas. Através da proliferação de linfócitos e dosagem sérica de anticorpos vacinais foi relatado que a  $\beta$ -glucana não evidenciou efeitos no sistema imune adaptativo. Apenas um efeito marginal da  $\beta$ -glucana foi observado no aumento da ingestão de ração, porém sem efeitos no ganho de peso dos animais.

Dritz et al. (1995) não verificaram diferenças no ganho de peso diário em suínos desmamados alimentados com diferentes concentrações de  $\beta$ -glucana após desafio com *Streptococcus suis*. No entanto, Decuypere et al., (1998) relataram aumento no ganho médio de peso diário de suínos suplementados com a  $\beta$ -glucana nos animais que permaneceram em instalações com as condições higiênicas inferiores. O ambiente e as condições sanitárias das instalações influenciam o efeito da  $\beta$ -glucana quando administrada via alimentação, como suplemento alimentar (HISS e SAUERWEIN, 2003).

Hetland et al. (1998) injetaram 100  $\mu$ g de  $\beta$ -glucana solúvel pela via intravenosa em camundongos BALB/c três dias antes e sete dias após desafio com bacillus Calmette-Guérin (BCG). Os resultados encontrados indicaram uma inibição da infecção dos

camundongos quatro semanas após o desafio. Essa proteção se deu principalmente pela ativação de macrófagos.

Yun et al. (2003) administrando  $\beta$ -glucana, derivada da aveia, pela via oral e parenteral, encontraram uma alteração na população de células T em camundongos susceptíveis (C57BL/6) inoculados com *Eimeria vermiformes*, com o aumento da frequência de esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$ , reduzindo de maneira significativa a eliminação de oocistos nos animais tratados quando comparados com o grupo controle. Ainda nesse estudo foram encontrados aumentos nos títulos de anticorpos específicos contra *E. vermiformes*, além de uma resposta imune celular específica. Esses resultados indicam um aumento na resistência do hospedeiro frente a uma infecção experimental.

Xiao et al. (2004) encontraram aumento na frequência de produção de IFN- $\gamma$  pelos monócitos do sangue periférico em suínos desafiados com o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV). Esse resultado foi obtido com a administração da  $\beta$ -glucana solúvel, porém a produção dessa citocina não foi relacionada com a presença do antígeno (PRRSV). Tanto a  $\beta$ -glucana solúvel quanto insolúvel não afetaram a frequência das células produtoras de IFN- $\gamma$  antígeno dependente. Esses resultados indicaram que a  $\beta$ -glucana aumenta preferencialmente a resposta imune mediada por linfócitos do tipo T auxiliar-1 (Th1), porém sem especificidade do agente. O fato de apenas a  $\beta$ -glucana na forma solúvel ter efeito nos monócitos, evidencia a presença de um receptor específico ligado à fagocitose.

Portanto, a eficácia do tratamento com  $\beta$ -glucanas depende da via de administração e da interação específica entre o parasita e o hospedeiro (REYNOLDS et al., 1980). A origem da  $\beta$ -glucana e a sua característica química, solúvel ou insolúvel, além das condições sanitárias das instalações podem influenciar o efeito do tratamento com a  $\beta$ -glucana (BROWN e GORDON, 2003; HISS e SAUERWEIN, 2003; XIAO et al., 2004).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do grande número de publicações sobre *T. gondii*, que tornou o parasita um dos mais estudados na área da parasitologia e saúde pública, muito se tem a apreender sobre o mesmo, pois ainda é grande a preocupação sobre os seus efeitos não só na população humana como também na animal.

A forma mais grave desta parasitose, a forma congênita da doença, ainda preocupa autoridades de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. A ciência, em especial a área de sanidade animal, tem a função de obter maiores informações sobre as possíveis formas de prevenção conhecidas, e propor medidas para o controle desta enfermidade. Por isso é importante o estudo da toxoplasmose nos animais de companhia e nos de produção, sendo os suínos um dos animais de produção que possui um papel chave na transmissão da doença aos seres humanos pela ingestão de carne crua ou mal cozida.

Como o suíno é um dos hospedeiros intermediário da toxoplasmose, os estudos de soroprevalência assumem um importante papel na determinação do risco de uma determinada população adquirir a toxoplasmose por meio da ingestão de carne infectada. Por meio desses estudos vem sendo possível melhorar as técnicas de criação de suínos, proporcionando uma carne de melhor qualidade aos consumidores. Com o ambiente adequado e o manejo sanitário, tanto das instalações, quanto dos animais sendo realizado de maneira correta diminui-se muito o risco de contaminação da carne suína pelo *Toxoplasma gondii*.

Porém, apenas essas medidas não são capazes de garantir uma carne livre de *T. gondii*. Portanto, as pesquisas com vacinas e imunomoduladores para a prevenção da infecção, bem como, o uso de métodos diagnósticos para serem aplicados aos animais ou tecidos no momento do abate; são de fundamental importância, para a prevenção da doença nos seres humanos. Os estudos que envolvem a infecção experimental são importantes para avaliar a imunopatogenia do parasita, cepas ou linhagens de *T. gondii*.

## 5 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; HUNTER, C.A. Immunoregulations during toxoplasmosis. **Chem. Immunol.**, v. 70, p. 81-102, 1998.

ANDREWS, C.D.; DUBEY, J.P.; TENTER, A.M.; WEBERT, D.W. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens H4 and H11: Use in ELISAs for detection of toxoplasmosis in swine. **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 1-11, 1997.

ARKO-MENSAH, J.; BOSOMPEM, K.M.; CANACOO, E.A.; WASTLING, J.M.; AKANMORI, B.D. The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. **Acta Tropica**, v. 76, p. 27–31, 2000.

BECKNER DA SILVA, A.C.; MITSUKA, R.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; JANKEVICIUS, S.I.; VIDOTTO, O.; JANKEVICIUS, J.V. Avaliação pela imunofluorescência indireta dos aspectos imunogênicos e antigênicos de diferentes amostras de *Toxoplasma Gondii* inoculadas em suínos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 17-22, 1994.

BONHOMME, A.; BOULANGER, F.; BHARADWAJ, L.M.; PUYGAUTHIER-TOUBAS, D.; BONHOMME, P.; PLUOT, M.; PINON, J.M. *Toxoplasma gondii*: immunocytochemistry of four immunodominant antigens with monoclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 439-451, 1990.

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**, v. 61, n. 5, p. 2082-2088, 1993.

BROWDER, I.W.; WILLIAMS, D.L.; KITAHAMA, A.; DI LUZIO, N.R.; Modification of post-operative *C. albicans* sepsis by glucana immunostimulation. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 6, p. 19-26, 1984.

BROWN, G.D.; GORDON, S. A new receptor for  $\beta$ -glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-37, 2001.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal  $\beta$ -Glucans and Mammalian Immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.

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

CAMELINI, C.M.; MENDONÇA, M.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M.  $\beta$ -Glucanas do Cogumelo. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 35, p. 36-47, 2005.

CAMUS, D.; ZALIS, M.G.; VANNIER-SANTOS, M.A; BANIC, D.M. The art of parasite survival. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 28, p. 399-413, 1995.

CARLETTI, R.T.; FREIRE, R.L.; SHIMADA, M.T.; RUFFOLO, B.B.; BEGALE, L.B.; LOPES, F.M.R.; Navarro, I.T. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no Estado do Paraná, Brasil. **Semina**, v. 26, n. 4, p. 563-568, 2005.

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

CARRUTHERS, V.B.; SIBLEY, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, n. 2, p. 114-123, 1997.

CHABBERT, E.; LACHAUD L.; CROBU L.; BASTIEN P. Comparison of Two Widely Used PCR Primer Systems for Detection of *Toxoplasma* in Amniotic Fluid, Blood, and Tissues. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 4, p. 1719-1722, 2004.

COPPENS, I.; ANDRIES, M.; LIU, J.L.; CESBRON-DELAUW. Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. **European Journal of Cell Biology**, v. 78, p. 463-472, 1999.

DECUYPERE, N.; DIERICK, N.; BODDEZ, S. The potentials for immunostimulatory substances ( $\alpha$ -1,3/1,6 glucans) in pig nutrition. **J. Anim. Feed. Sci.**, v. 7, p. 259, 1998.

DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R.T.; MARTIN, P.; SHER, A. Emergence of NK1.1+ cell as effector of INF- $\gamma$  dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I – deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 1465-72, 1993.

DI LUZIO, N.R.; WILLIAMS, D.L.; MCNAMEE, R.B.; EDWARDS, B.F.; KITAHAMA, A. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucana. **Int. J. Cancer**, v. 24, p. 773–779, 1979.

DIAS, R.A.F.; NAVARRO, I.T.; RUFFOLO, B.B.; BUGNI, F.M.; CASTRO, M.V.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 185-189, 2005.

DRITZ, S.S.; SHI, J.; KIELIAN, T.L.; GOODBAND, R.D.; NELSSSEN, J.L.; TOKACH, M.D.; CHENGAPPA, M.M.; SMITH, J.E.; BLECHA, F. Influence of Dietary b-Glucan on Growth Performance, Nonspecific Immunity, and Resistance to *Streptococcus suis* Infection in Weanling Pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 3341-3350, 1995.

DUBEY, J.P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 910-913, 1988.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming of human and animals. In KRIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. 2ed. San Diego : Academic Press, p. 1-157, 1993.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 205, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Vet. Parasitol.** v. 64, p. 65-70, 1996.

DUBEY, J. P. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 307-310, 1997.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **J. Protozool.**, v. 23, p. 537-546, 1976.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. **CRC Press**, Boca Raton, FL, p. 1-220, 1988.

DUBEY, J.P.; MURREL, K.D.; FAYER, R.; SCHAD, G.A. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. **J.A.V.A.M.A.**, v. 188, n. 9, p. 1035-1037, 1986.

DUBEY, J.P.; LEIGHTY J.C.; BEAL, V.C.; ANDERSON, W.R.; ANDREWS, C.D.; THULLIEZ, P. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 517-521, 1991.

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 nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 55, p. 982-987, 1994.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; WEIGEL, R.M.; ANDREWS, C.D.; LIND, P.; POWELL, E.C. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. **Am. J. Vet. Res.** v. 56, p. 1030-1036, 1995.

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

DUBREMETZ, J.F.; SCHWARTZMAN, J.D. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. **Research In Immunology**, v. 144, n. 1, p. 31-33, 1993.

DUSQUENE, V.; AURIAULT, C.; GRAS-MASSE, H.; BOUTILLON, C.; DARCY, F.; CESBRON-DELAUW, M-F.; TARTAR, A.; CAPRON, A. Identification T cell epitopes within a 23 KD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. **Clinical Experimental Immunology**, v. 84, p. 527-534, 1991.

ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S.W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 155-178, 1999.

FARREL, R.L.; DOCTON, F.L.; CHAMBERLAIN, D.M. Toxoplasmosis. I. *Toxoplasma* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 13, p. 181-185, 1952.

FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.893-897, 2003.

FISHER, H-G.; STACHELHAUS, S.; SAHM, M.; MEYER, H.; REICHMANN, G. GRA7, an excretory 29 KDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 251-262, 1998.

FITZPATRICK, F.W.; DICARLO, F.J. Zymosan. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 118, p. 233-236, 1964.

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). **Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 4, p. 388-396, 2003.

FRENKEL, J.K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 233-240, 1990.

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

GAMBLE, H.R.; DUBEY, J.P.; LAMBILLOTE, D.N. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma gondii* infection in the domestic pig. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 177-181, 2005.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.

GARCIA, J.L.; GENNARI, J.L.; 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**, v. 129, p. 209-217, 2005.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MACHADO, R.Z. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 267-271, 2006.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; BIAZZONO, L.; FREIRE, R.L.; GUIMARÃES JUNIOR, J.S.; CRYSSAFIDIS, A.L.; BUGNI, F.M.; CUNHA, I.A.L.C.; HAMADA, F.N.; DIAS, R.C.F. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 197-206, 2007.

GAZZINELLI, R.T.; HIENY, S.; WYNN, T.A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon  $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T. CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

- GILBERT, R.; COOK, A.; DUNN, D. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a European multicenter case-control study. **British Medical Journal**, v.312, p. 142-147, 2000.
- GOLDMAN, R.; JAFFE, C.L. Administration of  $\beta$ -glucan following *Leishmania major* infection suppresses disease progression in mice. **Parasite. Immunol.**, v. 13, p. 137-145, 1991.
- GROSS, U.; BOHNE, W.; LÜDER, C. G. K.; LUGERT, R.; SEEBER, F.; DITTRICH, C.; POHL, F.; FERGUSON, D. J. P. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal Eukariont Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 114S-116S, 1996.
- HETLAND, G.; LØVIK, M.; WIKER, H.G. Protective effect of  $\beta$ -glucan against *Micobacterium bovis*, BCG infection in BALB/c mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 47, p. 548-553, 1998.
- HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K.; GAMBLE, H.R. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 9-17, 2006.
- HISS, S.; SAUERWEIN, H. Influence of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. **J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.**, v. 87, p. 2-11, 2003.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii*: Analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. **Experimental Parasitology**, v. 78, p. 242-245, 1994.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p.1561-1566, 1995.
- JACOBS, L.; LUNDE, F. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs and man. **Public Health Rep.** v.72, n.10, p.872-882, 1957.
- JACOBS, D.; DUBREMETZ, J-F.; LOYENS, A.; BOSMAN, F.; SAMAN, E. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 237-249, 1998.

JAUREGUI, L.H.; HIGGINS, J.; ZARLENGA, D.; DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K. Development of a Real-Time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2065-2071, 2001.

JUNGERSEN, G.; JENSEN, L.; RIBER, U; HEEGAARD, P.M.H.; PETERSEN, E.; POULSEN, J.S.D.; BILLE-HANSEN, V.; LIND, P. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1307-1319, 1999.

KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J.P.; DARDE, M.L.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 14872-14877, 2007.

KIMATA, I.; TANABE, K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. **Journal of Cell Science**, v. 88, p. 231-239, 1987.

KOSKI, V.H. Evaluation of ELISA for the detection of *Toxoplasma* antibodies in swine sera. **Acta Vet. Scand.**, v. 31, p. 413-422, 1990.

KUMOLOSASI, E.; BONHOMME, A.; BEROCHIA, A.; FOU DRINIER, F.; MARX, C.; PLUOT, M.; PINON, J. M. Kinetics study of the localization and quantitation of target antigens of immunoglobulin antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. **Parasitology Research**, v. 82, n. 5, p. 402-409, 1996.

LANZER, M.; GROSS, U.; MOLL, H. Mechanisms of parasite persistence and immune evasion. **Parasitology Today**, v.13, n.1, p. 1-2, 1997.

LECORDIER, L.; MERCIER, C.; SIBLEY, L.D.; CESBRON-DELAUW. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 1277-1287, 1999.

LIND, P., HAUGE GAARD, J.; HENRIKSEN, S.A. The time course of specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 1-15, 1997.

MATEUS-PINILLA, N.E.; DUBEY, J.P.; CHOROMANSKI, L.; WEIGEL, R.M. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. **J. Parasitol.**, v. 85, n. 5, p. 855-860, 1999.

McLEOD, R.; MACK, D.; BROWN, C. *Toxoplasma gondii* – new advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 109-121, 1991.

MENDONÇA, A.O. **Detecção de *Toxoplasma gondii* em lingüiças suínas tipo frescal, comercializadas no município de Botucatu.** 2003 Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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**, v. 81, n. 4, p. 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 Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.

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

MORISAKI, J. H.; HEUSER, J. E.; SIBLEY, L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2457-2464, 1995.

NAKAGAWA, Y.; OHNO, N.; MURAI, T. Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 710-713, 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**, v. 13, p. 15-18, 1992.

NICHOLS, B.A; CHIAPPINO, M.L. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. **Journal Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 217-226, 1987.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L Sur une infection à corps de Leishman (ou organisme voisins) du gondi. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v.147, p.736-766, 1908.

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

OLIVEIRA, R.J.; MATUO, R.; SILVA, A.F.; MATIAZI, H.J.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R.; Protective effect of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells, **Toxicology In Vitro**, 2006.

OMATA, Y.; DILORENZO, C.; VENTURINI, C. VENTURINI, L.; IGARASHI, I. SAITO, A.; SUZUKI, N. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 51, n. 3, p. 205- 210, 1994.

PACHECO-SOARES, C.; DE SOUZA, W. Labeled probes inserted in the macrophage membrane are transferred to the parasite surface and internalized during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 86, n. 1, p.11-17, 2000.

PERKINS, M.E. Rhoptry organelles of Apicomplexa parasites. **Parasitology Today**, v. 8, n. 1, p. 28-32, 1992.

PINCKNEY, R.D.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; BOOSINGER, T.R.; MCLAUGHLIN, S.A.; DUBEY, J.P.; Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitology**, v. 80, p. 438-448, 1994.

REYNOLDS, J.A.; KASTELLO, M.D.; HARRINGTON, D.G.; CRABBS, C.L.; PETERS, C.J.; JEMSKI, J.V.; SCOTT, G.H.; DI LUZIO, N.R. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. **Infect. Immun.**, v. 30, p. 51-57, 1980.

ROSS, G. D.; VÌ TVIÈKA, V.; YAN, J.; XIA Y.; VÌ TVIÈKOVÁ, J. Therapeutic intervention with complement and  $\beta$ - glucan in cancer (Review). **Immunopharmacology**, v. 42, p. 61-74, 1999.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of America Medical Association**, v. 16, p. 801-807, 1941.

SADAK, A.; TAGHY, Z.; FORTIER, B. and DUBREMETZ, J.F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemical Parasitology** v. 29, p. 203-212, 1988.

SAFFER, L.D.; SCHWARTZMAN, J. D. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. **Journal Protozoology**, v. 38, n. 5, p. 454-460, 1991.

SAFFER, L.D.; MERCEREAU-PUJALON, O; DUBREMETZ, J.F.; SCHWARTZMAN, J.D. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. **Journal of Protozoology**, v. 39, n. 4, p. 526-530, 1992.

SETHI, K.K.; PIEKARSKI, G. Immunological aspects of toxoplasmosis. In: SOULSBY, E. J. L. Immune responses in **Parasitic infectious: immunology; immunopathology and immunoprophylaxis**. v. 3, CRC Press: Florida, 1987.

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

SILVEIRA, C., FERREIRA, R., MUCCIOLI, C., NUSSENBLATT, R., BELFORT, R. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **American Journal of Ophthalmology**, v.136, p.370-371, 2003.

SUAREZ-ARANDA, F.; ANDRADE, H. F; GALISTEO, A. J.; HIRAMOTO, R. M.; CARDOSO, R. P.; MEIRELES, L.R.; MIGUEL, O. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.91, p.23-32, 2000.

SUDA, M.; OHNO, N.; HASHIMOTO, T.; KOIZUME, K.; ADACHI, Y. YADOMAE, T. Kupffer cells play important roles in the metabolic degradation of a soluble anti-tumor (1→3)-β-D-glucan, SSG, in mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 15, p. 93-100, 1996.

SUZUKI, T.; TANAKA, H.; KINOSHITA, A.; OIKAWA, S.; OSAWA, M.; YADOMAE, T. Effect of orally administered beta-glucan in macrophage function in mice. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 12, p. 675-682, 1990.

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

TSUTSUI, V.S.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; FREITAS, J.C.; PRUDENCIO, L.B.; DELBEM, A.C.B.; MARANA, E.R.M. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 27-34, 2003.

TSUTSUI, V.S.; FREIRE, R.L.; GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; VIEIRA, D.P.; MARANA, E.R.M.; PRUDENCIO, L.B.; NAVARRO, I.T. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. **Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 1, p. 30-34, 2007.

VACHA, J.; ZNOJIL, V.; POSPISIL, M.; HOLA, J.; PIPALOVA, I. Microcytic anemia and changes in ferrokinetics as late after-effects of glucan administration in murine hepatitis virus-infected C57BL/10ScSnPh mice. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 16, p. 51-60, 1994.

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**, v. 68, n. 2, p. 969-972, 2000.

VIDOTTO, O.; COSTA, J.C. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. II. Parasitemia e Resposta Imunitária Humoral. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 39, n. 5, p. 783-794, 1987.

VIDOTTO, O.; COSTA, J.C.; BALARIN, M.R.S.; ROCHA, M.A. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. I. Observações clínicas e hematológicas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 39, n. 4, p. 623-639, 1987a.

VIDOTTO, O.; COSTA, J.C.; BALARIN, M.R.S.; ROCHA, M.A. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. III. Alterações Patológicas e Reisolamento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 39, n. 5, p. 795-814, 1987b.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L.; MITSUKA, R. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina –Pr. **Semina**, v. 11, n. 1, p. 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 Comp. Pathology**, v. 112, p. 53-62, 1995.

WILLIAMS, D.L.; YAEGER, R. G.; PRETUS, H. A.; BROWDER, I.W.; MCNAMEE, R. B.; JONES, E. L. Immunization against *Trypanosoma cruzi*: adjuvant effect of glucan. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 11, p. 403-410, 1989.

WORK, K.; ERIKSEN, L.; FENNESTAD, K.L. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinava**, v.78, p. 129-139, 1970.

XIAO, Z.; TRINCADO, C.A.; MURTAUGH, M.P.  $\beta$ -Glucan enhancement of T cell IFN- $\gamma$  response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, p. 315-320, 2004.

YAI, L.E.O.; VIANNA, M.C.B.; SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R.L.,  
RICHTZNHAIN, L.; GENNARI, S.M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii*  
(Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain  
reaction. **Braz. J. Vet. Res.**, v. 40, p. 227-234, 2003.

YUN, C.H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; PARK, B.C.; LAARVELD, B.  $\beta$ -glucan,  
extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections.  
**FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v. 35, p. 67-75, 2003.

## **OBJETIVOS**

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação da  $\beta$ -glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a cinética da resposta imune humoral nos suínos infectados experimentalmente pela via intramuscular com taquizoítos da cepa RH;
- Comparar os parâmetros hematológicos entre os animais tratados e os animais não tratados;
- Avaliar a proteção da  $\beta$ -glucana contra a infecção aguda por *T. gondii*;
- Comparar as técnicas da PCR e bioensaio para a detecção do *T. gondii* no sangue e nos tecidos.

**ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

### III. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### Ação da $\beta$ -Glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*.

##### Resumo

No presente trabalho foi avaliada a ação da  $\beta$ -Glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*. Foram utilizados oito suínos (21 dias de idade). Os animais foram divididos em três grupos: G1 ( $\beta$ -glucana e infectados, n=3), G2 (não tratados e infectados, n=3) e G3 (não tratados e não infectados, n=2). Os animais do G1 foram tratados com 1g de  $\beta$ -glucana pela via intramuscular (IM) nos dias 0, 14, e 28 antes da infecção experimental, enquanto os do G2 e G3 receberam apenas solução salina estéril. Os animais do G1 e G2 foram infectados com taquizoítos ( $10^7$ ) da cepa RH (IM), no dia 35 do experimento. A parasitemia foi determinada por PCR e bioensaio em camundongos a partir do sangue total de cada animal, colhido nos dias 3, 7, 14, 21, 31, 39, 47 e 69 pós-infecção. Os títulos de anticorpos contra *T. gondii* foram obtidos dos suínos pela imunofluorescência indireta (IFI) dos soros, humor aquoso e humor vítreo, considerando positivo um título  $\geq 64$ . Diferenças estatísticas foram observadas na avaliação dos teores de hemoglobina, percentual de hematócrito, valores de proteínas plasmáticas e na contagem de eosinófilos ( $P < 0,05$ ). Os suínos do G1 e G2 soro converteram sete dias pós-infecção, e o maior título encontrado foi de 1024 em dois animais. As amostras de humor aquoso e humor vítreo não revelaram títulos de anticorpos pela IFI. Parasitas no sangue foram detectados nos dias 3, 14, 31, 39 e 47 em dois animais do G1, e em três do G2. Não houve diferenças entre o PCR e o bioensaio. As avaliações das retinas tanto no bioensaio quanto no PCR foram negativas em todos os animais. Os animais do G3, permaneceram negativos durante todo o experimento. O uso da  $\beta$ -glucana, na forma como foi utilizada no presente trabalho, não foi efetiva no controle da infecção aguda contra taquizoítos inoculados pela via intramuscular em suínos. A linhagem da cepa RH mostrou-se não cistogênica para suínos (músculos e retina) 69 dias após a infecção.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, cepa RH, suínos,  $\beta$ -glucana, bioensaio, PCR.

**Abstract**

The present study tested the action of  $\beta$ -glucan in swine experimentally infected with tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. The experiment design used 8 mixed breed pigs (21 days) divided into three groups: G1 ( $\beta$ -glucan treated and infected, n=3), G2 (untreated and infected, n=3), and G3 (untreated uninfected, n=2). The G1 animals were treated with 1g of  $\beta$ -glucan by intramuscularly route at days 0, 14, and 28 before experimental infection, while the other groups (G2 and G3) received only saline. The G1 and G2 were infected with viable tachyzoites ( $10^7$ ) of the RH strain at day 35 of experiment. The parasitemy was determined by mouse bioassay and PCR from whole blood of each swine, obtained at days 3, 7, 14, 21, 31, 39, 47 e 69 post infections. The antibody levels of serum, aqueous and vitreous humor were measured by indirect immunofluorescence assay (IFA); a title  $\geq 64$  was considered as positive. There were differences in the hematocrit, hemoglobin, plasmatic proteins, and eosinophils values between groups ( $P < 0.05$ ). The swine of G1 and G2 serum converted 7 days post infection, and the highest title observed was 1024 in two pigs. Samples of aqueous and vitreous humor did not show antibodies against *T. gondii*. Parasite was detected of whole blood on days 3, 14, 31, 39, and 47 in two animals from G1, and three animals from G2. There were no differences between PCR and mouse bioassay. Animals from G3 remained without parasitemy by both PCR and bioassay throughout the experiment. The use of  $\beta$ -glucana, as was used here, was not protective for pigs against *T. gondii* tachyzoites acute infection. Additionally, the lineage of RH strain showed nonpersistent for pigs (muscles and retina) 69 days after infection.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, pigs, RH strain,  $\beta$ -glucan, PCR, bioassay.

## 1. Introdução

*Toxoplasma gondii* é um protozoário, pertencente ao Filo Apicomplexa, que pode infectar animais e seres humanos. É um parasita intracelular obrigatório e pode se multiplicar em todas as células nucleadas de seu hospedeiro (GARCIA et al., 2006a; JACOBS et al., 1998).

O suíno é uma das mais importantes fontes de infecção para o homem (DUBEY et al., 1991). Os cistos teciduais podem permanecer por mais de dois anos na carne suína (DUBEY et al., 1998). O risco de ingestão de cistos teciduais pelo consumo de carne de porco crua, mal cozida ou lingüiça já foi descrito na região de Londrina-PR (DIAS et al., 2005; NAVARRO et al., 1992). Navarro et al. (1992) encontraram em torno de 20% de amostras de carne de porco positivas para *T. gondii* na forma de cistos teciduais. Em outro estudo com lingüiças frescas também foram observadas amostras positivas, 13/149 (8,72%) pelo bioensaio em camundongos (DIAS et al., 2005).

As principais técnicas utilizadas para o diagnóstico direto do *T. gondii* em tecidos e sangue de animais são o bioensaio em camundongos e a PCR. Este último possui boa sensibilidade, alta especificidade e é uma técnica que pode ser realizada rapidamente (CHABBERT et al., 2004; YAI et al., 2003). Garcia et al. (2006b) e Tsutsui et al. (2007) verificaram um melhor desempenho do bioensaio em camundongos na detecção de *T. gondii* em tecidos de suínos quando comparados com a técnica da PCR.

A  $\beta$ -glucana é um dos principais componentes da parede celular das leveduras (OLIVEIRA et al., 2006). A extração da  $\beta$ -glucana de leveduras é decorrente da suspensão de partículas de  $\beta$ -1,3 polissacarídeos (DI LUZIO et al., 1979). A atividade das  $\beta$ -glucanas “in vitro” tem sido descrita como ativadoras diretas de leucócitos, estimulando fagocitose, citotoxicidade e atividades antimicrobiológicas. Os leucócitos que possuem atividades de receptores para as  $\beta$ -glucanas são os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células exterminadoras naturais (EN), além de outras células não pertencentes ao sistema imune, tais como: células endoteliais, do epitélio alveolar e fibroblastos (BROWN e GORDON, 2003).

As glucanas com estas características podem levar resistência ao hospedeiro frente a infecções causadas por microorganismos como bactérias, protozoários, vírus e doenças causadas por fungos (BROWDER et al., 1984; GOLDMAN e JAFFE, 1991; OLIVEIRA et al., 2006; VACHA et al., 1994).

Hetland et al. (1998) injetaram 100  $\mu$ g de  $\beta$ -glucana solúvel pela via intravenosa em camundongos BALB/c três dias antes e sete dias após desafio com bacillus Calmette-Guérin

(BCG). Os resultados encontrados indicaram uma inibição da infecção dos camundongos quatro semanas após o desafio. Essa proteção se deu principalmente pela ativação de macrófagos.

Tendo em vista a importância epidemiológica do suíno na cadeia de transmissão da toxoplasmose, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o uso da  $\beta$ -glucana extraída do *Saccharomyces cerevisiae*, como imunoestimulante, em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos de *T. gondii*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Amostras de *T. gondii***

A cepa RH isolada por Sabin (1941) de uma criança com encefalite foi utilizada para infecção experimental dos suínos e para a realização da reação de Imunofluorescência Indireta (IFI).

### **2.2. Preparo da suspensão de taquizoítos de *T. gondii***

Para a obtenção dos taquizoítos da amostra RH, cinco camundongos foram inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de taquizoítos vivos ( $10^5$ /mL) em salina estéril (NaCl 0,85%), obtidos através de lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados, segundo Garcia et al. (2004). Uma vez purificadas, as amostras foram padronizadas em  $10^7$  /mL por contagem em câmara de Neubauer (DUBEY e FRENKEL, 1976).

### **2.3. Animais**

Oito suínos cruzados (Landrace x Large White) com 21 dias de idade foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos em baias individuais com água e ração à vontade na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, até o término do experimento (104 dias).

Camundongos Suwis-Webster fêmeas, entre 45 a 60 dias (pesando entre 25 e 40g), foram utilizados para replicar a cepa RH pela via intraperitoneal para obtenção de taquizoítos e no bioensaio.

Todos os animais, bem como os procedimentos realizados, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob o processo de número 12/2007.

### **2.4. Delineamento Experimental**

Os animais foram divididos em três grupos: G1, G2 e G3; com três animais no G1 e G2 e com dois no G3 (Tabela 1). Todos os animais foram abatidos em frigorífico com inspeção federal após 69 dias da infecção. No abate foram obtidas amostras de músculos (masseter, língua, coração e diafragma) e dos olhos (direito e esquerdo) para avaliação da presença de cistos teciduais, bem como soro, humor aquoso e vítreo para detecção de anticorpos contra *T. gondii*.

Os sinais clínicos e as temperaturas foram aferidas nos dias 35, 38, 40, 42, 49, 56, 66, 74 e 82 do experimento. Amostras de sangue com e sem EDTA foram obtidas por punção da veia cava caudal utilizando-se agulhas descartáveis de 40x12mm. As amostras com EDTA foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UEL para realização de hemograma completo. Uma alíquota deste sangue foi utilizada para avaliar a parasitemia pelo bioensaio em camundongos e PCR. O soro obtido foi armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização da IFI.

**Tabela 1.** Delineamento experimental.

Grupo Experimental	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 35	Dia 104
G1- $\beta$ -glucana n=3 (I, II, III)	1g $\beta$ -glucana IM	1g $\beta$ -glucana IM	1g $\beta$ -glucana IM	$10^7$ taquizoítos (RH) IM	Abate
G2 – Controle positivo n=3 (IV, V, VI)	Salina IM	Salina IM	Salina IM	$10^7$ taquizoítos (RH) IM	Abate
G3 – Controle negativo n= 2 (VII, VIII)	Salina IM	Salina IM	Salina IM	Salina IM	Abate

IM= Via Intramuscular.

## 2.5. Extração da $\beta$ -glucana

A  $\beta$ -glucana utilizada no presente trabalho foi extraída de *S. cerevisiae* e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Raúl J. H. Castro Gómez, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (Departamento de Ciências Tecnológicas de Alimentos) da UEL. A escolha da  $\beta$ -glucana a partir da levedura de panificação foi realizada pela facilidade de obtenção e crescimento.

A autólise da levedura de panificação foi realizada adicionando-se água destilada até a obtenção de aproximadamente 25% (p/v) de sólidos totais. Em seguida o pH foi ajustado para 5,0 - 5,5 e a suspensão assim obtida levada à temperatura de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após 24 horas, a suspensão foi centrifugada a  $3000 \times g$  durante seis minutos. Os sólidos úmidos obtidos após centrifugação correspondem à parede celular. A extração da  $\beta$ -glucana insolúvel foi realizada

seguindo o procedimento preconizado por Supphantharika et al. (2003). Após a extração a  $\beta$ -glucana foi solubilizada.

## **2.6. Diagnóstico Sorológico**

Os soros (camundongos e suínos) e humores aquoso e vítreo dos suínos foram submetidos à IFI para a pesquisa de anticorpos IgG contra *T. gondii* (CAMARGO, 1973). Foram considerados positivos os camundongos que apresentaram títulos maiores ou iguais a 16 e os suínos que apresentaram títulos maiores ou iguais a 64.

## **2.7. Bioensaio**

### **2.7.1 Avaliação da Parasitemia**

A parasitemia seguiu metodologia descrita por Costa et al. (1977), com modificações. O sangue obtido com anticoagulante foi inoculado em três camundongos pela via intraperitoneal (0,5 mL/camundongo). Os camundongos foram observados diariamente e após 45 dias de inoculação realizou-se a eutanásia. Procedeu-se o *imprint* de cérebro, exame microscópico para a pesquisa de cistos e colheita de soro para IFI.

### **2.7.2 Pesquisa de *T. gondii* nos Tecidos dos Suínos**

As amostras de tecido dos suínos (músculos e retina) foram processadas e inoculadas em camundongos Suwis-Webster, para se verificar biologicamente a presença de cistos teciduais (DUBEY, 1998). As amostras de retina de cada animal (olhos direito e esquerdo) foram maceradas em graal estéril e filtradas em gaze com 3 mL de salina estéril (NaCl 0,85%), e após adicionar penicilina-estreptomicina, foram inoculadas em três camundongos pela via intraperitoneal (1 mL/camundongo).

As amostras de músculos foram processadas a partir de um pool contendo 6,25 g de língua, masseter, diafragma e coração de cada animal, totalizando 25 g de músculos. Este pool muscular foi macerado e homogeneizado em 125 mL de salina. Após homogeneização, foram adicionados 125 mL de fluido digestivo artificial (2,6 g de pepsina, 5,0 g de NaCl, 7,0 mL de HCl e 500 mL de água q.s.p.). Os homogeneizados foram incubados a 37 °C por 60 minutos sob agitação e posteriormente filtrados em gaze com oito dobras. As porções de 250 mL foram centrifugadas a 1.180 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 50 mL de solução salina-bicarbonato (1,2%) e novamente centrifugado. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 5 mL de salina com penicilina-estreptomicina e posteriormente inoculado em camundongos. Para cada amostra de

pool muscular e retina foram inoculados três camundongos pela via subcutânea (1 mL/camundongo) (DUBEY, 1998).

Após 45 dias inoculação, os camundongos foram anestesiados para coleta de sangue e posteriormente sofreram eutanásia para realização de *imprint* de cérebro, exame microscópico para a pesquisa de cistos e colheita de soro para IFI.

## 2.8. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

### 2.8.1 Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos e do sangue foi realizada conforme descrito previamente por Garcia (2006b). Após a homogeneização da amostra, 300 µL foram transferidos para um micro tubo com igual volume de tampão de extração (200 mM NaCl, 20 mM Tris, 50 mM EDTA, proteinase K 1 mg/mL e 2% SDS) e incubadas a 56 °C por 1 hora. Após, 300 µL de fenol tamponado foram adicionados e centrifugados por 13.000 x g durante 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugado por 13000 x g durante 5 minutos. A precipitação do DNA foi realizada com acetato de sódio e etanol (SAMBROOK et al., 1989).

### 2.8.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

As amostras submetidas à PCR foram: sangue (EDTA), retina e pool de músculos (produto da digestão péptica).

A amplificação do DNA do *T. gondii* seguiu metodologia descrita por Homan et al. (2000). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) foram utilizados para amplificar um segmento de 529 pares de bases (pb) do DNA do *T. gondii* (GenBank nº [AFI46527](#)). Este fragmento repete-se de 200 até 300 vezes no genoma do *T. gondii* (HOMAN et al., 2000).

A reação de PCR foi realizada com uma mistura contendo 5 µL da solução obtida na extração mais 20 µL (volume final de 25 µL) da mistura de 1,0 mM de cada primer, 100 mM dNTP (Invitrogen, life technologies, USA), 60 mM Tris±HCl (pH 9,0), 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, life technologies, USA). A amplificação do DNA do *T.gondii* foi obtida ao fim de 35 ciclos no termociclador PTC-100 (MJ-Research), realizando a reação com as seguintes condições: 7 minutos a 94 °C para a desnaturação no ciclo um; seguido de 33 ciclos, com 1 minuto a 94 °C para a desnaturação, 1 minuto a 55 °C para o anelamento e 1 minuto a 72 °C para a extensão. No ciclo 35 foi realizada uma extensão

final de 10 minutos a 72 °C. Aliquotas de todos os PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%. Controles positivos e negativos foram adicionados em cada reação. Taquizoítos da cepa RH ( $10^7$ / mL) foram diluídos em uma amostra de sangue, digestão péptica e retina. Foi realizada a extração do DNA dessas amostras para o uso como controle positivo. O controle negativo consistiu na extração do DNA das mesmas amostras sem a adição do *T.gondii*.

### **2.8.3 Sensibilidade da PCR**

Para obtenção da sensibilidade da PCR taquizoítos da cepa RH, obtidos conforme descrito no item 2.2, foram preparados em concentrações de  $10^7$  a  $10^{-1}$  equivalente de taquizoítos/ mL de TE. Posteriormente, fez-se a extração do DNA e a PCR conforme descrito no item 2.8.1.

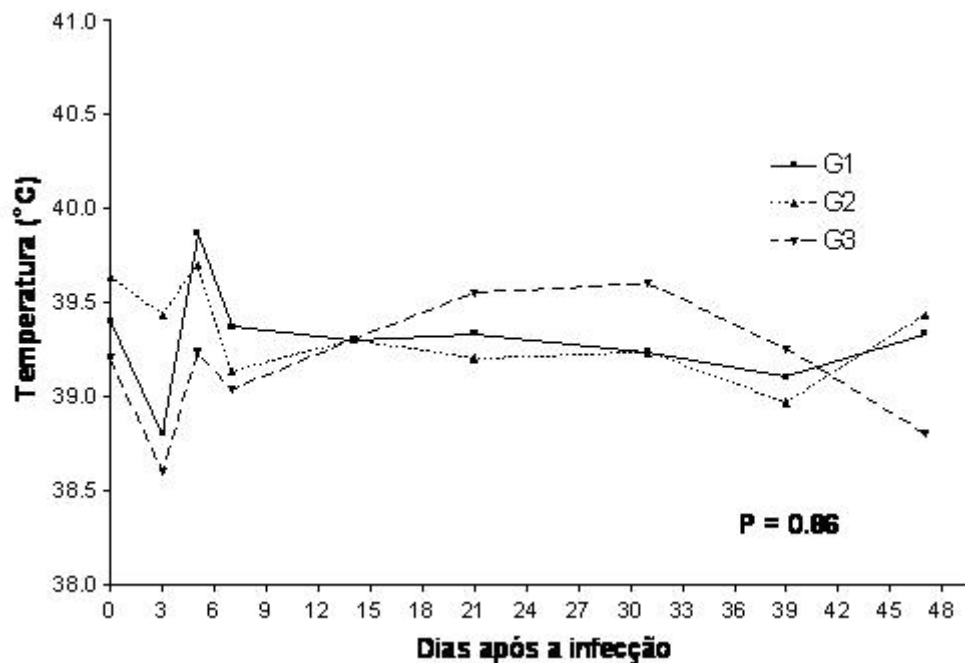
### **2.9. Análise Estatística**

As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo ANOVA. O teste t de Student foi utilizado para averiguar diferenças estatísticas entre os grupos. Para avaliar as diferenças entre as porcentagens de detecção da parasitemia utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Utilizou-se o nível de significância de 5%.

### 3. Resultados

#### 3.1. Sinais Clínicos

Os suínos que foram infectados com a cepa RH (G1 e G2) apresentaram tosse secreção ocular e aumento de temperatura entre o terceiro e o quinto dia pós-infecção (dpi) (Fig. 1). Embora se tenha observado um leve aumento na temperatura corporal dos animais do G1( $39,9\pm 0,32$  °C) e do G2( $39,7\pm 0,1$  °C) no quinto dpi não foram observadas diferenças estatísticas com relação à temperatura corporal entre os grupos,  $G1=39,3\pm 0,28$  °C,  $G2=39,3\pm 0,19$  °C, e  $G3=39,2\pm 0,37$  °C.



**Fig. 1.** Temperatura retal dos suínos dos três grupos experimentais (G1= $\beta$ -glucana + infectado, G2=infectado, G3=controle). Os animais foram infectados com  $10^7$  taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular no dia 0.

### 3.2. Valores Hematológicos

Os resultados hematológicos estão representados nas Figuras 3, 4 e 5. Houve diferença significativa entre os grupos nos resultados do hematócrito (Fig.2),  $\mu G1=34,5\pm 3,41$ ,  $\mu G2=35\pm 0,96$ ,  $\mu G3=31,7\pm 3,52$  ( $P=0,02$ ,  $G2\neq G3=0.009$ ); hemoglobina (Fig.2),  $\mu G1=11,1\pm 1,24$ ,  $\mu G2=11,5\pm 1,49$ ,  $\mu G3=9,83\pm 1,08$  ( $P=0,04$ ;  $G2 \neq G3=0,02$ ); dos eosinófilos (Fig.3),  $\mu G1=249\pm 156$ ,  $\mu G2=49\pm 43$ ,  $\mu G3=87\pm 111$  [ $P=0,004$ ;  $G1 \neq G2$  ( $P=0,004$ );  $G1 \neq G3$  ( $P=0,03$ )] e das proteínas plasmáticas (Fig.4),  $\mu G1=7,28\pm 0,377$ ,  $\mu G2=7,05\pm 0,321$ ,  $\mu G3=6,67\pm 0,403$  [ $P=0,01$ ;  $G1\neq G3$  ( $P=0,007$ )].

Entretanto não foram observadas diferenças entre os grupos nos resultados de contagem de hemácias (Fig.2),  $\mu G1=5,79\pm 0,57$ ,  $\mu G2=5,61\pm 0,47$ ,  $\mu G3=5,2\pm 0,61$  ( $P=0,13$ ); leucócitos (Fig.2),  $\mu G1=18209\pm 2913$ ,  $\mu G2=16439\pm 4436$ ,  $\mu G3=15551\pm 5283$  ( $P=0,32$ );