



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IVO ALEXANDRE LEME DA CUNHA

**IMUNIZAÇÃO DE SUÍNOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS
E RECOMBINANTE (rROP2) DO *Toxoplasma gondii* PARA
PROTEÇÃO CONTRA A FORMAÇÃO DE CISTOS
TECIDUAIS**

Londrina
2015

IVO ALEXANDRE LEME DA CUNHA

**IMUNIZAÇÃO DE SUÍNOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS
E RECOMBINANTE (rROP2) DO *Toxoplasma gondii* PARA
PROTEÇÃO CONTRA A FORMAÇÃO DE CISTOS
TECIDUAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C972i Cunha, Ivo Alexandre Leme da.
Imunização em suínos com proteínas de roptrias e recombinante (rROP2) do
Toxoplasma gondii para proteção contra a formação de cistos teciduais / Ivo
Alexandre Leme da Cunha. – Londrina, 2015.
76 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,
2015.
Inclui bibliografia.

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

CDU 619:577.27

IVO ALEXANDRE LEME DA CUNHA

**IMUNIZAÇÃO DE SUÍNOS COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS E
RECOMBINANTE (rROP2) DO *Toxoplasma gondii* PARA PROTEÇÃO
CONTRA A FORMAÇÃO DE CISTOS TECIDUAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco
Universidade Estadual do Centro-Oeste –
UNICENTRO

Prof. Dr. Dauton Luiz Zulpo
Pontifícia Universidade Católica do Paraná –
PUCPR

Londrina, 26 de Janeiro de 2015.

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL) como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia.

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

- 1. CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ MEC.**
- 2. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ MCT.**
- 3. UEL – Universidade Estadual de Londrina – PROPPG.**

*À minha esposa **Kátia** e
à **Kamila, Gabriel e João Pedro**
pela presença e apoio incondicional*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** por tudo e acima de tudo, hoje e sempre.

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. João Luis Garcia** pelo compromisso com o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal, orientação de extremo valor.

Agradeço ao **Prof. Dr. Italmar Teodorico Navarro** por apoiar, aconselhar e estar presente em todas as etapas na minha vida acadêmica e profissional, presença indispensável.

Agradeço ao **Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura** pela compreensão sobre as etapas do crescimento acadêmico e profissional e pelo aceite em fazer parte da banca de avaliação.

Agradeço ao **Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco** pelo aceite de imediato e disposição em fazer parte da banca, pela amizade e pela boa convivência.

Agradeço ao **Prof. Dr. Dauton Luiz Zulpo** pela amizade construída ao longo desses anos bem e pelas contribuições para minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço aos Professores **Dr. Odilon Vidotto** e **Dr. Ademir Benedito da Luz Pereira** e à Professora **Dra. Roberta Lemos Freire** por estarem presentes em grande parte de minha acadêmica e por fazer parte da banca examinadora de qualificação, contribuição fundamental.

Agradeço à minha esposa **Kátia Cristina Souza da Cunha** e aos meu filhos **Kamila, Gabriel e João** por entender e aceitar as dificuldades e desafios enfrentados pelo marido e pai doutorando.

Agradeço à minha mãe **Maria Jordina Timóteo da Cunha**, ao meu pai **Antônio de Pádua Leme da Cunha** (in memoriam) e aos meus irmãos **Fernando Rogério Leme da Cunha, Cláudio Marcelo Leme da Cunha** e **Hugo Henrique Leme da Cunha** pelo incentivo desde o início.

Agradeço ao Prof. **Dr. Jayme Augusto Peres** por atender as minhas solicitações, frente às exigências do doutorado, quando foram necessárias.

Agradeço ao Prof. **Dr. Caio Abércio da Silva** toda sua equipe, pelo apoio dado ao projeto através da Fazenda Escola.

Agradeço aos pós graduandos e colegas de trabalho **MSc. Luiz Daniel de Barros, MSc. Alessandra Taroda, MSc. Jonatas Campos de Almeida, MSc. Sérgio Tosi Cardim, MSc. Ana Sue Sammi** e **MSc. Ana Carolina Miura**, pelo compromisso

assumido no projeto e pela amizade de valor sem igual.

*Agradeço a servidora e pós graduanda **Beatriz Nino** pelas contribuições, amizade e boa vontade junto às atividades a ela solicitadas.*

*Agradeço à servidora **Dra. Elizabete Regina Marangoni** pelo apoio em todos os momentos.*

Agradeço aos Estagiários pelas atividades realizadas e, sem eles, possivelmente não haveria condições para realizar os trabalhos.

Agradeço à todos os pós graduandos dos laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública, Parasitologia e Protozoologia.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão do projeto.

Sabedoria

Mais ágil que todo o movimento é a Sabedoria, ela atravessa e penetra tudo, graças à sua pureza. Ela é um sopro do poder de Deus, uma irradiação límpida da glória do Todo-poderoso; assim mancha nenhuma pode insinuar-se nela. É ela uma efusão da luz eterna, um espelho sem mancha da atividade de Deus, e uma imagem de sua bondade.

Sb 7, 24-26

Se alguém deseja uma vasta ciência, ela sabe o passado e conjectura o futuro; conhece as sutilezas oratórias e revolve os enigmas; prevê os sinais e os prodígios, e o que tem que acontecer no decurso das idades e dos tempos. Portanto, resolvi tomá-la por companheira de minha vida, cuidando que ela será para mim uma boa conselheira, e minha consolação nos cuidados e na tristeza.

Sb 8, 8-9

“Nada Resiste ao Trabalho”.

E. J. Zerbini

CUNHA, I. A. L. **Imunização de suínos com proteínas de roptrias e recombinante (rROP2) do *Toxoplasma gondii* para proteção contra a formação de cistos teciduais.** 2014. 76 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório que acomete todos os animais homeotermos e o homem. O consumo de carne suína crua ou mal cozida contendo cistos é considerada uma das mais importantes fontes de infecção para o ser humano. Assim, o desenvolvimento de vacinas, objetivando a proteção contra a formação de cistos teciduais, pode contribuir para o controle do *T. gondii*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta imune e a proteção contra a presença do *Toxoplasma gondii* em tecidos de suínos imunizados com proteínas nativas de roptrias e proteína recombinante (rROP2) do *T. gondii*, pelas vias intranasal e intramuscular. No primeiro experimento, foram utilizados 13 suínos mestiços, divididos em três grupos, G1 (n=6) receberam proteínas de roptrias (200 µg) associadas ao Quil-A (50 µg), G2 (n=4) e G3 (n=3) receberam Quil-A (50 µg) e PBS, respectivamente. Os tratamentos foram administrados em intervalos de 21 dias pela via nasal. Sete dias após a última dose da vacina dois animais do G1 foram eutanasiados para coleta de linfonodos mesentéricos e os demais animais do G1 foram desafiados com 10^3 oocistos infectantes da cepa VEG e abatidos 45 dias após o desafio. A imunidade humoral (IgG e IgM) e a imunidade celular foram avaliadas pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e por proliferação de linfócitos, respectivamente, e a presença de cistos nos cérebros dos suínos foi avaliada pela técnica de bioensaio em camundongos. Em conclusão, a imunização em suínos pela via nasal com proteínas de roptrias e Quil-A como adjuvante foi capaz de estimular alta resposta celular em linfócitos de linfonodos mesentéricos e proteção parcial contra a formação de cistos cerebrais. No segundo experimento foram utilizados 12 suínos mestiços, divididos em três grupos, G1 (n=4) receberam proteínas recombinantes ROP2 do *T. gondii* (200 µg) associadas ao ISCOMATRIX, G2 (n=4) e G3 (n=4) receberam ISCOMATRIX e PBS, respectivamente. Todos os tratamentos foram administrados pela via nasal nos dias 0, 14, 28, 42, 56 e 72 e pela via intramuscular nos dias 86, 93 e 100. No dia 110 todos os animais foram desafiados com 4×10^4 oocistos infectantes da cepa VEG. A imunidade humoral (IgG, IgM e IgA) foi avaliada utilizando ELISA e a presença de *T. gondii* no sangue e tecidos (língua, masseter, coração e diafragma) foi avaliada pela técnica de bioensaio em camundongos. Todos os animais do G1 produziram anticorpos (IgG, IgM e IgA) acima do ponto de corte, no dia do desafio. Animais do G2 e G3 permaneceram com títulos abaixo do ponto de corte antes do desafio. Após o desafio foi observada produção de altos títulos de anticorpos produzidos nos animais imunizados e soro conversão observada em nove dias pós desafio nos animais do grupo controle e foi observada proteção parcial contra a presença do *T. gondii* nos tecidos. Como conclusão as proteínas de roptrias do *T. gondii* administradas pela via nasal com Quil-A estimularam a resposta imune celular intestinal e as proteínas recombinantes do *T. gondii* administradas pela via intramuscular com ISCOMATRIX estimularam a produção de altos títulos de anticorpos em suínos e em ambos os estudos foram verificadas a proteção parcial contra a presença de cistos teciduais do *T. gondii*. Para um melhor estímulo da resposta imune, estudos sobre imunização em suínos envolvendo duas ou mais proteínas recombinantes do *T. gondii* associadas na mesma vacina devem ser avaliadas no futuro, além de estudos sobre imunizações objetivando a redução de lesões oculares causadas pelo *Toxoplasma gondii* em suínos.

Palavras-chave: Roptrias. rROP2. Toxoplasmose. Vacina. Proteção. Via nasal e intramuscular.

CUNHA, I. A. L. **Immunization of pigs with crude rhoptries proteins and recombinant (rROP2) proteins of *Toxoplasma gondii* to protect against the formation of tissue cysts.** 76 p. Thesis (PhD in Animal Science) - State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that affects all warm-blooded animals and humans. Pork meat containing tissue cysts is considered one of the most important routes of transmission to humans. Vaccination of domestic animals, aiming to reduce the number of tissue cysts, may be one of the strategies for the control of *T. gondii*. The aim of this study was evaluate the immune response and protection against the presence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs immunized with crude rhoptry proteins and recombinant proteins (rROP2) of *T. gondii* by intranasal and intramuscular route. In the first experiment we used 13 mixed-breed pigs divided into the following three groups: G1 (vaccinated-challenged, n = 6), which received the rhoptry vaccine (200 (g/dose); G2 (adjuvant-challenged, n = 4), which received PBS plus Quil-A; and G3 (unvaccinated-challenged, n = 3), which was the control group. The treatments were performed intranasally at days 0, 21, and 42. Three pigs from G1 produced IgG and IgM antibody levels above the cut-off in the ELISA on the challenge day. Partial protection was observed in G1 at the chronic phase of infection when compared with G3. The preventable fractions were 41.6% and 6.5%, in G1 and G2, respectively. The results of this study suggest that rhoptry proteins plus Quil-A stimulated humoral, local, and systemic immune responses, which were able to partially protect the brain from cyst formation. In the second experiment we used 12 mixed-breed pigs divided into three groups, G1 (vaccinated-challenged, n=4) received recombinant ROP2 proteins (200µg/ dose), G2 (adjuvant-challenged, n=4) received PBS plus Quil-A, and G3 (unvaccinated-challenged, n=3) was considered control group. The treatments were performed at days 0, 14, 28, 42, 56 e 72 by intranasal route and days 86, 93 e 100 by intramuscular route. At day 110, all animals of this study were challenged with 4×10^4 infective oocysts of the VEG strain. The animals were examined daily for clinical signs. Humoral immune response (IgG, IgM and IgA) were evaluated weekly by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The presence of *T. gondii* in blood and tissues (tongue, masseter muscle, heart and diaphragm) was assessed by bioassay in mice. All the animals of G1 produced antibodies (IgG, IgM and IgA) above the cut-off point on the day of challenge. The G2 and G3 remained with titers below the cut-off point before the challenge. It was observed high production of antibodies titers in immunized animals and seroconversion at day 9 after challenge in the animals from control group. Partial protection against presence of *T. gondii* in tissues was observed. For better stimulation of the immune response, immunization studies in pigs involving two or more recombinant proteins of *T. gondii* associated in the same vaccine should be evaluated in the future. Studies of immunization aiming to reduce eye damage caused by *Toxoplasma gondii* in pigs should also be encouraged.

Keywords: Rhoptry. rROP2. Toxoplasmosis. Vaccine. Protection. Intranasally. Intramusculary.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

3 ARTIGO PUBLICADO

- Figura 1** – Rectal temperature of pigs from G1, G2 and G3..... 48
- Figura 2** – IgG and IgM antibody responses measure by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from pigs of the G1, G2 and G3. 48
- Figura 3** – Lymphocyte proliferation response from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and mesenteric lymph nodes (MLNs) from G1 (two animals) at challenge day (day 49)..... 48

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1** – Temperatura retal (média±DESVPAD) de suínos do G1, G2 e G3. 68
- Figura 2** – Imunidade humoral anti-rROP2 do *Toxoplasma gondii* em suínos (média±EPAD) analisadas pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). 69

LISTA DE TABELAS

3 ARTIGO PUBLICADO

Tabela 1 – Outcome of <i>Toxoplasma gondii</i> mouse bioassay performed from pig brains after treatments and challenged with oocysts of VEG strain.....	49
--	----

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Tabela 1 – Resultado da avaliação da presença <i>Toxoplasma gondii</i> , pelo bioensaio em camundongos, em sangue e tecidos de suínos após desafio com oocistos esporulados da cepa VEG do <i>Toxoplasma gondii</i>	70
--	----

LISTA DE QUADROS

1 REVISÃO

Quadro 1 – Frequência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em suínos no Brasil.	28
Quadro 2 – Estudos sobre imunizações contra toxoplasmose realizados em suínos nos anos de 1991 a 2013	29

SUMÁRIO

1	REVISÃO – <i>Toxoplasma gondii</i> EM SUÍNOS: PERSPECTIVAS EM VACINAS	16
1.1	INTRODUÇÃO	16
1.2	TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS.....	19
1.3	CARNE COMO IMPORTANTE FONTE DE INFECÇÃO.....	21
1.4	VACINAS E IMUNIZAÇÃO EM SUÍNOS.....	22
1.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
1.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
2	OBJETIVOS	43
2.1	OBJETIVO GERAL	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3	ARTIGO PUBLICADO – HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES IN PIGS IMMUNIZED INTRANASALLY WITH CRUDE RHOPTRY PROTEINS OF <i>Toxoplasma gondii</i>	44
4	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM SUÍNOS IMUNIZADOS COM PROTEÍNA RECOMBINANTE (rROP2) DO <i>Toxoplasma gondii</i> ASSOCIADA AO ISCOMATRIX	51
4.1	RESUMO	52
4.2	ABSTRACT	53
4.3	INTRODUÇÃO	54
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.4.1	Animais	55
4.4.2	Cepas do <i>Toxoplasma gondii</i>	55
4.4.3	Obtenção de Formas Infectantes do <i>T. gondii</i>	56
4.4.4	Obtenção das Proteínas Recombinantes	57
4.4.4.1	Construção dos plasmídeos.....	57
4.4.4.2	Condições de cultura.....	58
4.4.4.3	Purificação de rTgROP2	58
4.4.5	Preparo da Vacina ISCOMATRIX + rROP2.....	59

4.4.6	Delineamento Experimental.....	59
4.4.7	Avaliação da Imunidade Humoral	60
4.4.8	Pesquisa do <i>T. gondii</i> dos Tecidos	61
4.4.8.1	Avaliação da parasitemia	61
4.4.8.2	Bioensaio em camundongos	62
4.4.9	Análise Estatística	62
4.5	RESULTADOS	63
4.5.1	Sinais Clínicos	63
4.5.2	Resposta Immune Humoral.....	63
4.5.3	Pesquisa de <i>T. gondii</i> nos tecidos.....	64
4.6	DISCUSSÃO	64
4.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
4.8	REFERÊNCIAS.....	71
	CONCLUSÃO.....	76

1 REVISÃO – *Toxoplasma gondii* EM SUÍNOS: PERSPECTIVAS EM VACINAS.

1.1 INTRODUÇÃO

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

Foi primeiramente descrito por Splendore (1908) que isolou o parasita em um coelho de laboratório em São Paulo e posteriormente Nicolle e Manceaux (1908) no Instituto Pasteur de Túnis na Tunísia descreveram em um roedor (*Ctenodactylus gundi*) da África do Sul. Ambos os grupos relacionaram a nova descoberta com *Leishmania* e, somente em 1909, Nicolle e Manceaux reclassificaram o novo parasita como *T. gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) sendo a única espécie do gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2010).

Toxoplasma gondii é estruturalmente formado por uma membrana externa, anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, microtúbulos, retículo endoplasmático, complexo de golgi, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, microporo e um núcleo com parede bem definida (DUBEY, 1994; METSIS; PETERSEN, 1995). Possui três estágios de infecção: taquizoítos, bradizoítos (cistos em tecidos) e esporozoítos (oocistos) (DUBEY, 1994). O parasita possui a capacidade de invadir uma enorme variedade de células nucleadas, tecidos e hospedeiros (CARRUTHERS, 2002). Devido às suas características biológicas, tem sido utilizado como importante modelo para estudos biológicos do filo Apicomplexa (ROOS et al., 1999).

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

Os gatos domésticos e felídeos selvagens são os hospedeiros definitivos do parasita e os únicos a eliminarem oocistos pelas fezes (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970). Após a ingestão de taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos, ocorre a fase de esquizogonia no epitélio intestinal dos felídeos, levando à formação dos oocistos (DENKERS

et al., 1993). Os períodos pré-patentes são de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos, maiores que 18 dias após a ingestão de oocistos (DUBEY, 2001) e maiores que 19 dias após a ingestão de taquizoítas (DUBEY, 2010). Os oocistos são eliminados através das fezes sob a forma não esporulada (não infectante) e a esporulação ocorre no meio ambiente entre 1 a 5 dias dependendo das condições de temperatura e umidade (DUBEY et al., 1998).

Entre os hospedeiros intermediários, encontra-se o homem e os animais domésticos e selvagens (MILLER; FRENKEL; DUBEY, 1972; CARRUTHERS, 2002). Hospedeiros intermediários podem adquirir o *T. gondii* pela ingestão de tecidos de animais infectados com cistos, alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, ou por transmissão transplacentária (DUBEY, 1994).

Normalmente, *T. gondii* parasita o hospedeiro sem causar sinais clínicos (FISHER et al., 1998). Porém, quando ocorrem, estão relacionados à espécie, idade do hospedeiro, gestação, condições nutricionais e imunológicas, quantidade de inóculo do parasita, estágio infectante e infecções concomitantes (DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1994; LIESENFELD et al., 2001; DUBEY; JONES, 2008). O microorganismo é capaz de causar uma doença congênita severa em fetos, encefalites em indivíduos imunocomprometidos e alterações oculares em animais e humanos (DUBEY, 1994; KUMOSASAKI et al., 1996; FISHER et al., 1998; JACOBS et al., 1998; SILVEIRA et al., 2003).

A toxoplasmose em humanos ocorre com frequência sob a forma de infecção crônica e assintomática, sendo encontrada em todos os continentes, inclusive no continente Antártico. De uma forma geral, a prevalência é maior na América Latina quando comparada com a América do Norte e Leste da Ásia (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009) e a soro prevalência encontrada em gestantes varia de 4% na Coreia a 92% no Brasil (RYU et al., 1996; FIGUEIRO-FILHO et al., 2005). O Brasil apresenta ocorrência de anticorpos em humanos que se encontram entre as mais elevadas do mundo, com prevalências entre 37% e 91% (DETANICO; BASSO, 2006; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005; MANDAI; LOPES; MITSUKA-BREGANÓ, 2007; LAGO et al., 2009). Nos Estados Unidos e Reino Unido a prevalência estimada é de 16 a 40%, na América Central e do Sul e na Europa, a prevalência é de aproximadamente 50 a 80% (TENDER; HECKEROTH; WEISS, 2000; JONES et al., 2001).

Apesar da baixa incidência da toxoplasmose congênita, seu impacto econômico é elevado e está relacionado à gravidade da infecção, complicações associadas, tratamento e custos sociais (ROBERTS; FRENKEL, 1990; ROBERTS; MURRELL; MARKS, 1994). A infecção no início da gestação, pode causar aborto ou má-formação fetal,

sendo que as crianças podem apresentar hidrocefalia, coriorretinite, calcificação cerebral e retardo mental (DUNN et al., 1999), conhecida como a Tétrade de Sabin (SABIN, 1942) ou podem nascer normais e desenvolver sequelas durante a infância ou na fase adulta. Além disso, pode levar a reativação da infecção crônica em gestantes, podendo ocorrer a formação de lesões oculares na mãe além da transmissão congênita (ANDRADE et al. 2010).

Mitsuka-Breganó; Lopes; Navarro (2010) propuseram medidas relacionadas ao diagnóstico, tratamento e condutas das gestantes com objetivo de evitar a toxoplasmose congênita, focando na prevenção da ingestão de oocistos presentes no solo, água e alimentos, de cistos presentes na carne e da ingestão de taquizoítas. Como medidas de prevenção da infecção pelo *Toxoplasma gondii*, os autores descreveram cuidados com a alimentação de gatos, que deve ser realizada somente com ração ou carne cozida, a manipulação da terra somente com luvas, a retirada mecânica de impurezas das frutas e vegetais, o controle de moscas e baratas, a ingestão de carnes somente bem cozidas, o congelamento dos produtos cárneos por sete dias e também, práticas de higiene como no manuseio de carnes cruas, como lavar as mãos e superfície de preparação (tábuas e facas).

A toxoplasmose ocular pós-natal em humanos pode ser caracterizada por lesões similares as da toxoplasmose ocular congênita (MAENZ et al., 2014) ocorrendo concomitantemente com a parasitemia ou após um intervalo de tempo (STEHLING; ORÉFICE, 1996) podendo comprometer de forma irreversível a visão (SILVEIRA et al., 2001). A forma ocular da doença foi tradicionalmente considerada uma doença de manifestação congênita (GLASNER et al, 1992;. GILBERT; STANFORD, 1999), no entanto, alguns estudos (SILVEIRA et al., 2001; HOLLAND, 2003; STANFORD; TAN; GILBERT, 2006) mostram que a maioria dos casos são devido à doença adquirida, o que significa que toda a população pode potencialmente desenvolvê-la e não somente indivíduos com toxoplasmose congênita. Casos de doença adquirida foram relatados por Gilbert; Stanford (1999); Silveira; Belfort; Burnier (1987); Glasner et al. (1992); Belfort Jr et al. (1999), nos quais foram analisadas aproximadamente 150 famílias com irmãos não gêmeos com lesões oculares e também, mães com sorologia negativa e filhos com lesões oculares. Gilbert; Stanford (1999) relataram que aproximadamente 2/3 dos pacientes que apresentam toxoplasmose ocular adquiriram a infecção após o nascimento.

1.2 TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS

A toxoplasmose em suínos foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América por Farrel et al. (1952). No Brasil, o primeiro relato dessa parasitose em suínos foi feito por Silva (1959) que descreveu um caso no estado de Minas Gerais baseado no diagnóstico histológico. Posteriormente, Amaral; Macruz (1969), em São Paulo, e Schenk; Lima; Viana (1976), em Minas Gerais, isolaram o parasita do diafragma e do cérebro de suínos, clinicamente saudáveis, abatidos para consumo humano.

Em suínos a apresentação é frequentemente assintomática (FISHER et al., 1998), mas casos severos são caracterizados por dispneia, fraqueza, anorexia, hipertermia, cianose, diarreia, fraqueza em membros posteriores e morte (DUBEY, 2009; DUBEY, 2010) e alterações reprodutivas (BASSO et al., 2014).

A maior parte das infecções naturais por *T. gondii* em suínos se dá pela ingestão de oocistos presentes no ambiente (OKAMOTO et al., 1989) ou alimentos e rações contaminadas com oocistos (DUBEY, 2010) e roedores portando cistos teciduais representam uma importante fonte de infecção para os suínos. Kijlstra et al. (2008) analisaram a presença de *T. gondii* nos tecidos de roedores, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real, capturados em três propriedades de suinocultura orgânica na Holanda e encontraram prevalência de 10,3% (4/39) em *Rattus norvegicus*, 6,5% (2/32) em *Mus musculus*, 14,3% (1/7) em *Apodemus sylvaticus* e 13,6% (3/22) em *Crocidura russula*. A soroprevalência em suínos abatidos nessas propriedades era de 8 a 17% e caiu para 0 a 10% durante a vigência do programa de controle de roedores. Após quatro meses do programa, a infecção por *T. gondii* esteve ausente nos suínos de duas das três fazendas investigadas e apareceu novamente em uma dessas duas fazendas após o encerramento da campanha de controle de roedores.

Na espécie suína a presença de resposta imune humoral do *T. gondii* está relacionado com a presença de cistos teciduais (DUBEY, 2009; VERHELSTA et al., 2011). Diversos estudos relatam taxas de isolamento do *T. gondii*, em suínos soropositivos, de 31,7% (DUBEY et al., 1995), de 25% (DOS SANTOS et al., 2005), de 62,5 % (CLEMENTINO-ANDRADE et al. 2013) e 69,2% (MIURA, 2014).

Em um inquérito nacional de base populacional realizado nos EUA em 1983-1984, a soroprevalência foi de 23,9% em suínos destinados ao abate e 42% em fêmeas matrizes (DUBEY et al. 1991). Quando os animais de algumas dessas áreas foram testados em 1992, a soroprevalência de *T. gondii* caiu para 20,8% em animais de cria e 3,1% em

animais de terminação (DUBEY et al., 1995). Houve um constante declínio na prevalência de *T. gondii* em suínos em quatro inquéritos realizados nos EUA em 1990 (10,05%), 1996 (20%), 1998 (3,2-15%) e 2009 (2,65%) (ZIMMERMAN et al., 1990; PATTON et al., 1996; PATTON et al., 1998; HILL et al., 2010).

Desde a década de 80 estudos relatam um declínio na prevalência de toxoplasmose em suínos em todo o mundo (DUBEY, 2009). No entanto existe uma tendência mundial recente de criação de suínos orgânicos ou extensivos que pode levar ao aumento da soroprevalência nesses animais (MEERBURG et al., 2004, 2006; VAN DER GIESSEN et al. 2007; KIJLSTRA et al. 2004, 2004a, 2008; KIJLSTRA; MEERBURG; BOS., 2009). Nos EUA a criação orgânica segue regulamentações os suínos devem ter acesso ao ambiente externo inclusive em pastagens para ruminantes (NOP, 2014). No Brasil a suinocultura orgânica é regulamentada somente para os sistemas semi-intensivo ou extensivo não sendo permitida a utilização de quimioterápicos (BRASIL, 2011). Dubey et al. (2012) estudou a prevalência de toxoplasmose em suínos de criação orgânica nos Estados Unidos da América utilizando o teste de aglutinação modificado (MAT) e encontrou prevalência de 90,9% (30/33) onde obteve cepas de *T. gondii* isoladas de corações de 17 suínos, inclusive de um animal negativo na sorologia. No Brasil, alguns estudos encontraram soro prevalências em suínos produzidos em sistemas de criação semi-intensiva ou extensiva, de 20,6% (FRAZÃO-TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2001) e 25,5% (SOUZA et al., 2014) e sistema artesanal (22,5%) (CADEMARTORI et al., 2012).

Na década de 90 a soroprevalência em suínos, em alguns países europeus, também diminuiu em razão do manejo intensivo (DUBEY, 2009). Na Áustria, a soroprevalência de 14% em 1982 diminuiu para 0,9% em 1992 (EDELHOFER, 1994). Posteriormente, anticorpos contra *T. gondii* foram detectados pela técnica de ELISA em 42 dos 807 (5,2%) amostras de soro obtidos em carne de suínos abatidos na Suécia (LUNDE'N et al., 2002). Na província de Yunnan, no sudoeste da China, anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em 16,97% (141/831) das amostras, sendo os suínos para abate com a maior taxa (22,28%), seguido de fêmeas reprodutoras (16,59%), utilizando o teste de hemaglutinação indireta (HI) (ZOU et al., 2009).

Em diversos estudos sorológicos para toxoplasmose em suínos de diferentes categorias realizados no Brasil (Quadro 1) a prevalência tem variado 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) com extremos variando de 0% (BRANDÃO et al., 2006) a 90,4% (GUIMARÃES et al., 1992).

No Brasil, na região norte do estado do Paraná, também se observou uma diminuição na soroprevalência para a toxoplasmose em 2003 (15,35%) e 2005 (4%) (TSUITSUI et al., 2003; CARLETTI et al., 2005), quando comparado aos resultados de Vidotto et al. (1990) (37,84%) e Garcia et al. (1999) (24%) relacionado a implantação de modernas técnicas de criação intensiva de suínos (HOVE; LIND; MUKARATIRWA, 2005; DUBEY, 2009) durante o período.

Além disso, existem regiões onde há produção e consumo de carne suína não fiscalizada pelos órgãos competentes e Freitas et al. (2009) encontrou frequência de 50% de positivos em suínos destinados ao abate clandestino em Belém – PA, concluindo elevado risco sanitário para a saúde humana.

1.3 CARNE COMO IMPORTANTE FONTE DE INFECÇÃO.

No ano de 2012, a produção mundial de carne suína chegou a 111,7 milhões de toneladas, obtendo um crescimento de 42,6% nos últimos 17 anos (ROPPA, 2014). No mesmo ano no Brasil foram produzidos 3,49 milhões de toneladas de carne suína com mais de 580 mil toneladas exportadas para 60 países e o consumo *per capita* da população brasileira no ano de 2012 foi de 15,1Kg (ABIPECS, 2013). Associado a isso, a demanda global de alimento esta projetada para aumentar por volta de 70% até 2050 como resultado do aumento populacional superior a 9 bilhões de pessoas.

A disseminação da infecção ao humano é favorecida pela alta prevalência da infecção nos animais domésticos. Entre os animais destinados à alimentação humana, suínos, ovinos, e caprinos são os mais propensos a infecção quando comparados com equinos e bovinos. (NAVARRO et al., 1992; DUBEY, 1994).

O fato de que os cistos podem permanecer viáveis na musculatura dos suínos infectados por até 875 dias (DUBEY, 2010) e não serem detectáveis ao abate, torna esse alimento uma das principais fonte de infecção para os seres humanos (DUBEY et al., 1991; DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1998) quando ingerido cru ou mal cozido (KOSKI, 1990). Segundo Dubey; Jones (2008), uma taxa de infecção de 1% equivaleria a um milhão de suínos infectados destinados ao consumo humano nos EUA. Qualquer peça de carne suína infectada pode ser uma fonte de infecção, pois o *T. gondii* foi encontrado na maioria dos tecidos comestíveis ou cortes de carne tanto experimentalmente quanto naturalmente infectados (DUBEY; MURRELL; FAYER, 1984). Um suíno de 50 kg comercializado seria responsável por mais de 300 porções de carne e estima-se que um animal possa ser consumido

por 200-400 pessoas, pois muitos produtos são produzidos com carne suína (FEHLHABER; HINTERSDORF; KRUGER, 2002). Segundo Dubey; Murrel; Fayer (1984), estes produtos são responsáveis por 50 a 75% de todos os casos de toxoplasmose humana nos Estados Unidos.

Na Europa, três grandes estudos caso-controle identificaram a carne crua ou mal cozida como o fator de risco mais importantes para gestantes mulheres (KAPPERUD et al, 1996; COOK et al., 2000). O consumo de carne mal cozida foi a causa de infecção em 30-60% das gestantes com toxoplasmose aguda segundo Cook et al., 2000. Pequenos surtos de toxoplasmose têm sido associados ao consumo de carne crua na Coreia, EUA, Guiana Francesa e Nova Zelândia (CHOI et al., 1997; ROSS et al., 2001; LAKE; HUDSON; CRESSEY, 2002).

O risco de adquirir a infecção pelo 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). Em algumas localidades, a ingestão de embutidos artesanais preparados com carnes desta espécie é uma via de transmissão importante, não só para os indivíduos que a ingerem, mas também para aqueles que estão envolvidos com a sua preparação (SPALDING et al., 2005). Dias et al. (2005) demonstraram, por meio do bioensaio em camundongos, a presença de cistos de *T. gondii* em 13 das 149 (8,7%) amostras de lingüiças de origem suína tipo frescal, concentradas com 2,0 a 2,5% de sal e coletadas no local de produção.

Evidência indireta do risco de infecção pela carne vem da observação de que a prevalência de *T. gondii* é menor em indivíduos vegetarianos estritos (HALL et al., 1999; ROGHMANN et al., 1999). Em um estudo realizado nos EUA, uma diminuição significativa do risco de infecção pelo *T. gondii* foi encontrada em membros do grupo religioso Adventistas do Sétimo Dia. Segundo os autores, um possível fator de proteção estava relacionado à alimentação dos membros dessa comunidade que, por razões religiosas, mantinham uma dieta ovo-lacto-vegetariana, isenta de carnes de mamíferos, aves e frutos do mar (ROGHMANN et al., 1999).

1.4 VACINAS E IMUNIZAÇÃO EM SUÍNOS

A vacinação dos animais domésticos pode ser uma das estratégias para o controle do *T. gondii* e tem dois objetivos: reduzir as perdas econômicas provocada pelos danos reprodutivos e reduzir o número de cistos teciduais. Assim, pode-se diminuir o risco da

infecção ao homem pela ingestão de cistos em carnes cruas ou mal cozidas (DUBEY, 1996).

Embora a vacinação seja uma medida importante no controle da toxoplasmose, atualmente, apenas uma vacina (TOXOVAX[®], MSD Animal Health, Summit, NJ, USA) é comercializada na Nova Zelândia, Grã-Bretanha, Irlanda e França para uso em ovinos e caprinos para evitar a toxoplasmose congênita (GARCIA et al., 2014).

A vacina TOXOVAX[®] é composta por taquizoítos vivos da cepa S48 do *Toxoplasma gondii* que perdeu sua capacidade em formar cistos nos tecidos, após sucessivas passagens em camundongos, tornando-se uma cepa incompleta (O'CONNELL; WILKINS; TE PUNGA, 1988) não sendo capaz de estabelecer uma infecção persistente nos animais (BUXTON, 1993). Cada dose recomendada da vacina contém aproximadamente 10⁵ taquizoítas em volume de 2 ml e deve ser administrada em dose única, três semanas antes do acasalamento em animais com idade acima de cinco meses de idade. A imunidade induzida por essa vacina apresenta duração de até 18 meses e seu potencial para evitar a formação de cistos teciduais é desconhecido (GARCIA et al., 2014).

Como desvantagens, a TOXOVAX[®] oferece risco de infecção aos seres humanos que manipulam a vacina, tem um curto prazo de validade, alto custo, pode reverter a virulência e levar o animal a apresentar sinais clínicos (BHOPALE, 2003; STANLEY et al., 2004) e não pode ser administrada próximo às estações de monta ou durante a gestação (BUXTON, 1993).

Uma vacina que promova imunidade protetora contra o *T. gondii* contendo proteínas que são expressas em comum nos três estágios infectantes do parasita (esporozoíto, taquizoíto e bradizoíto) e a escolha da via de imunização adequada, são de fundamental importância para o desenvolvimento de imunidade protetora (SPEER et al., 1995; GARCIA et al., 2004; GARCIA, 2009) e que induza imunidade de mucosa suficiente para impedir a penetração do esporozoíto no intestino (BUXTON et al., 1989).

O uso de vacinas pela via nasal associadas a adjuvantes apropriados podem induzir uma resposta imune tanto local como sistêmica (VELGE-ROUSSEL; MARCELO; LEPAGE, 2000) e requer menos antígenos que a via oral, devido à menor atividade proteolítica. Considerando que a porta de entrada natural do *T. gondii* é a superfície da mucosa do intestino, Bonenfant et al. (2001) ressalta a importância do desenvolvimento de uma vacina que estimule a proteção de mucosa. Esta via tem sido utilizada com sucesso para diminuir a formação de cistos teciduais em camundongos. Igarashi et al. (2008) encontrou redução na formação de cistos teciduais utilizando as proteínas recombinantes ROP2, GRA1 e GRA7 e toxina colérica como adjuvantes. A imunização de mucosa também foi estudada em

camundongos através de vacinas administradas pela via nasal com proteínas SAG 1 e toxina colérica (DEBARD; BUZONI-GATEL; BOUT, 1996; VELGE-ROUSSEL; MARCELO; LEPAGE, 2000) ou endotoxinas (BONENFANT et al., 2001) como adjuvantes, onde foram observadas imunidade local e sistêmica e redução do número de cistos teciduais quando comparados ao grupo controle. Garcia et al. (2007) e Zulpo et al. (2012) encontraram diminuição da eliminação de oocistos por gatos, após administração de proteínas de roptrias pela via nasal.

A imunogenicidade das vacinas de subunidade deve ser melhorada com o uso de adjuvantes, e múltiplas doses são necessárias para o desenvolvimento de uma imunidade protetora prolongada, que, normalmente, estimula a resposta imune humoral e dependendo do adjuvante, podem estimular a resposta imune celular (GARCIA, 2009; GARCIA; INNES; KATZER, 2014).

O desenvolvimento de vacinas para prevenir a formação de lesões típicas da toxoplasmose ocular, como consequência da toxoplasmose adquirida devem ser estimuladas além do desenvolvimento de imunomoduladores como método para evitar a reativação em pacientes com toxoplasmose ocular crônica (GARCIA; INNES; KATZER, 2014).

Em suínos os principais estudos sobre avaliação da resposta imune se iniciaram na década de 90 (Quadro 2).

Dubey; Urban; Davis (1991) vacinaram suínos com 10^6 taquizoítos da cepa RH e desafiou-os com 10^4 e 10^5 oocistos esporulados de um pool de 10 cepas (P10) (Me-49, GT-1, PT-2, Aldrin e outras seis cepas isoladas em suínos) e encontrou menor infecção nos animais vacinados, utilizando a técnica de bioensaio em camundongos, comparados ao grupo controle. A porcentagem de camundongos positivos para *T. gondii* inoculados com tecidos digeridos de animais não vacinados foi maior (60%) quando comparados com camundongos inoculados com tecidos dos animais vacinados (31,6% - tecidos digeridos; 18,3% - tecidos não digeridos).

Em outro trabalho, DUBEY et al. (1994) não isolaram *T. gondii* em nenhum dos quatro suínos imunizados com 10^5 taquizoítas da cepa RH e desafiados 220 dias após a vacina, com 10^3 oocistos de P10, enquanto que nos quatro animais não vacinados e desafiados, isolaram o parasita no cérebro de três suínos e também na língua e no coração de dois e de um animal, respectivamente.

Da mesma forma, Pinckney et al. (1994) estudaram a segurança e a eficácia na prevenção de formação de cistos teciduais através da imunização com a cepa Ts-4 em suínos jovens. Nenhum dos animais dos grupos que receberam a vacina com Ts-4

desenvolveram sinais clínicos ou morreram, nem se conseguiu recuperar essa cepa dos tecidos dos animais inoculados. Porém, após desafio com outra cepa cistogênica a Ts-4 não preveniu contra a formação de cistos teciduais, o que demonstra a necessidade de mais estudos para avaliar a capacidade desta cepa em prevenir a formação de cistos em suínos.

Suínos imunizados com oocistos de *T. gondii* irradiados com 0,4 kilogray (kGy) de Césio-137 (^{137}Cs) desenvolveram imunidade protetora. Após desafio com oocistos infectantes os animais permaneceram clinicamente normais, mas desenvolveram cistos teciduais (DUBEY et al., 1998). Os mecanismos de indução da resposta imune por infecção por oocistos irradiados não foram totalmente esclarecidos, mas Dubey et al. (1998a) verificaram que oocistos irradiados com ^{137}Cs (0,40 kGy) liberaram esporozoítas capazes de penetrar nas células intestinais e linfonodos mesentéricos de camundongos, no entanto, os esporozoítas não se multiplicaram após a penetração.

Freire et al. (2003) imunizaram suínos com uma vacina utilizando-se de antígenos de superfície do *T. gondii* incorporados ao Complexo Imuno Estimulante (ISCOM) e após o desafio verificaram que a vacina foi capaz de estimular uma forte resposta imune humoral e não isolaram, por bioensaio, cistos teciduais nos animais vacinados.

Kringel et al., (2004) vacinaram suínos com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* com oligodeoxynucleotídeos (ODN) sintéticos específicos de suínos e imunoestimulador (CpG) (dias 0 e 26) e desafiaram com 10^4 oocistos infectantes da cepa VEG (DUBEY, 1996) (dia 49).

Após as imunizações, títulos IgG anti-*T. gondii*, analisados pela técnica do MAT até 10 vezes maior nos grupos vacinados comparado com o controle antes do desafio. Após o desafio, os autores observaram proteção clínica significativa nos animais vacinados, não encontrando alterações nas temperaturas dos animais vacinados comparados aos controles. Os autores relatam também, que 52% dos animais vacinados não desenvolveram cistos teciduais.

Garcia et al. (2005) utilizaram proteínas brutas de roptrias do *T. gondii* incorporadas ao ISCOM administradas pela via sub-cutânea em suínos e, após desafio, verificaram proteção parcial contra formação de cistos no grupo vacinado, quando comparado ao grupo controle positivo, mas não observaram proteção contra manifestação clínica como hipertermia, secreção ocular, prostração entre outros. Relata ainda, que a imunização sistêmica não foi eficaz em estimular uma proteção de mucosa intestinal.

Jongert et al. (2008) estudaram uma vacina contendo “pool” de plasmídeos expressando as proteínas GRA1 e GRA7 administradas em duas doses (dias 0 e 21) pela via

intradérmica em suínos e desafiaram (dia 49) com 2×10^3 cistos de *T. gondii* da cepa IPB-G pela via intraperitoneal. Após as imunizações os autores verificaram alta resposta de IgG e resposta imune celular específica contra as proteínas GRA1 e GRA7 estudadas. Após o desafio foram detectados altos títulos de IgG contra as proteínas GRA1 e GRA7 comparada ao grupo controle. Os autores relataram a possibilidade deste tipo de vacina proteger contra a formação de cistos teciduais.

Cunha et al. (2012) utilizaram proteínas brutas de roptrias da cepa LIV-5 do *Toxoplasma gondii* (GARCIA et al., 2004) incorporadas ao imunoestimulante Quil-A, que é uma saponina obtida da planta *Quillaja saponária*. A imunização nos suínos foi realizada pela via nasal em três doses com intervalos de 21 dias e, após desafio com 10^3 oocistos da cepa VEG (DUBEY, 1996), verificaram alta proliferação de linfócitos mesentéricos e proteção parcial contra formação de cistos teciduais no cérebro dos animais do grupo vacinado e não observaram proteção contra manifestação clínica.

Wang et al. (2013) imunizaram suínos com antígenos secretados-excretados do *Toxoplasma gondii*, extraídos do sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas com taquizoítas do *T. gondii*, associados ao adjuvante de Freund. A vacina foi administrada pela via subcutânea e após o desafio com taquizoítas, pela via intraperitoneal, os autores relataram proteção contra os sinais clínicos e contra formação de lesões em vários órgãos além de redução na formação de cistos teciduais e produção de resposta imune humoral e celular.

1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos 24 anos, apenas onze estudos sobre as respostas dos suínos frente a diversos imunógenos do *Toxoplasma gondii* e imunoestimulantes estão disponíveis na literatura mundial, sendo quatro desses estudos realizados no Brasil, com o penúltimo publicado no ano de 2012 (CUNHA et al., 2012) como parte integrante do presente trabalho. Essa quantidade de trabalhos deve ser considerada pequena, em todos os níveis, pois é necessária a compreensão de que as estratégias de imunizações contra a toxoplasmose podem ser de grande importância na prevenção e controle dessa enfermidade animais e seres humanos e, quanto maior a compreensão do problema, maior é a atração e formação de pesquisadores e mobilização de financiamentos.

Durante uma década após o início das pesquisas com imunógenos contra *T. gondii* em suínos foram utilizados apenas modelos vacinais vivos com estudos envolvendo subunidades do parasita se iniciando apenas no ano de 2003 e sendo estudado até os dias

atuais com proteínas nativas, de subunidades ou secretadas/excretadas do parasita e em apenas um deles se utiliza a tecnologia da vacina de DNA. Em todos esses estudos, preconizou-se o uso uma mistura de diversas proteínas o que confere uma resposta mais efetiva.

Por outro lado é necessário também o desenvolvimento e uso de proteínas recombinantes do *Toxoplasma gondii*, em estudos envolvendo imunizações em suínos para verificar se a ocorre a proteção contra a presença do parasita nos tecidos com resultados similares aos estudos já realizados, envolvendo imunizações com o parasita vivo ou com proteínas nativas estruturais.

Diversos estudos já foram concretizados em camundongos e, no entanto, pesquisas devem ser realizadas com suínos, pois os mecanismos que envolvem a resposta imune são diferentes e também, além da carne suína ser uma importante fonte de infecção para os seres humanos, os suínos são modelos biológicos para estudos.

Assim, devido aos problemas relacionados com a toxoplasmose ocular pós natal em seres humanos, estudos sobre imunizações objetivando a redução de lesões oculares causadas pelo *Toxoplasma gondii*, utilizando os suínos como modelos biológicos, também carecem na literatura e devem ser estimulados.

Quadro 1. Frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos no Brasil.

Região/Estado	% Positivos	Positivos/total	Teste	Referência
Centro Oeste				
Goiás	27,74	(230/829)	HAI	Matos et al. (1999)
Mato Grosso	12,8	(91/708)	RIFI	Murano et al. (2010)
Nordeste				
Pernambuco	4,7	(11/259)	RIFI	Caporali et al. (2005)
Bahia	18,27	(85/465)	ELISA	Bezerra et al. (2009)
Paraíba	36,2	(47/130)	RIFI	Azevedo et al. (2010)
	19,5	(37/190)	RIFI	Feitosa et al. (2014)
Alagoas	26,9	(92/342)	RIFI	Valença et al. (2011)
Norte				
Rondônia	37,5; 43,7	(30/80; 35/80)	MAT; RIFI	Cavalcante et al. (2006)
Mato Grosso	12,8	(91/708)	RIFI	Muraro et al. (2010)
Piauí	25,5	(36/143)	ELISA	Souza et al. (2014)
Sudeste				
Minas Gerais	90,4	-	RIFI	Guimarães et al. (1992)
	0	(0/72)	ELISA	Brandão et al. (2006)
	0	(0/187)	MAT	Pezerico et al. (2007)
Rio de Janeiro	65,8	(25/38)	RIFI	Bonna et al. (2006)
	7,64	(31/406)	RIFI	Luciano et al. (2011)
	11,5	(7/61)	ELISA	Frazão-Teixeira et al. (2011)
São Paulo	22,8	-	HAI	Amaral et al. (1975)
	25,7; 19,1	-	RIFI	Correa et al. (1978)
	47	-	RIFI	Vasconcelos et al. (1979)
	57,9; 42,1	-	RIFI; HA	D'Angelino et al. (1986)
	29,72	(74/249)	-	Barci et al. (1998)
	9,6	(29/300)	ELISA	Suaréz-Aranda et al. (2000)
	0,8	(4/500)	RIFI	Caporali et al. (2005)
	17	(49/286)	MAT	Dos Santos et al. (2005)
	8,5	(18/203)	RIFI	Lima et al. (2007)
	20,2	(111/550)	MAT	Oliveira et al. (2007)
0	(0/187)	MAT	Pezerico et al. (2007)	
4,5	(14/306)	MAT	Fornazari et al. (2009)	
Sul				
Paraná	37,8	(428/1031)	RIFI	Vidotto et al. (1990)
	24	(64/267)	RIFI	Garcia et al. (1999)
	15,35	(80/521)	RIFI	Tsutsui et al. (2003)
	4,0	(17/424)	RIFI	Carletti et al. (2005)
	8,54	(10/117)	RIFI	Moura et al. (2007)
	1,8; 23,1	-	MAT	Silva et al. (2008)
	25,5	(104/408)	RIFI	Millar et al. (2008)
	13,4	(81/606)	MAT	Piassa et al. (2010)
	7,9	(28/353)	MAT	Rosa et al. (2011)
	Rio Grande do Sul	18	(56/200)	HAI
9,5; 9,4; 33,3		(26/274; 26/278; 80/240)	ELISA	Araújo et al. (1998)
33,75; 20		(33/240; 48/240)	RIFI; HAI	Fialho et al. (2003)
22,5		(18/80)	RIFI	Cademartori et al. (2012)
Santa Catarina	1,16	(12/1033)	HAI	Wentz et al. (1988)
	86,1	(99/115)	MAT	Silva et al. (2000)

¹HAI: SF: Sabin-Feldman; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; HA: hemaglutinação indireta; MAT: teste de aglutinação modificado; ELISA: ensaio imunoenzimático. **Fonte:** o próprio autor.

Fonte: o próprio autor

Quadro 2. Estudos sobre imunizações contra toxoplasmose realizados em suínos nos anos de 1991 a 2013.

Imunização	Desafio	Testes	Principais Resultados	Referências
10 ⁶ RH ^T ; im.	10 ⁴ , 10 ⁵ (10 cepas) ^{ooc}	MAT; bio.	Proteção contra sinais clínicos; redução do número de cistos teciduais	Dubey; Urban; Davis. (1991)
10 ⁵ RH ^T ; Dose única; im.	10 ³ (10 cepas) ^{ooc}	MAT; bio; hist; Imu.	Proteção contra sinais clínicos e formação de lesões; redução do número de cistos teciduais	Dubey et al. (1994)
3x10 ⁵ TS-4 ^T ; 0, 14; sc.	8x10 ⁴ GT-1 ^{ooc}	MAT; bio; hist; Imu.	Redução do número de cistos teciduais	Pinckney et al. (1994)
10 ⁵ VEG ^{ooc} (0,3; 0,4 kGy ¹³⁷ Cs) 0, 38; vo.	10 ⁵ ; 10 ⁶ VEG ^{ooc}	MAT; bio.	Proteção contra sinais clínicos	Dubey et al. (1998)
Ag. superfície LIV-5 (ISCOM); sc.	5x10 ⁴ AS-28 ^{ooc}	RIFI	Resposta imune humoral	Freire et al. (2003)
RH ^T (CPG ODN); im.	10 ⁴ VEG ^{ooc}	MAT; ELISA; bio.	Proteção parcial	Kringel et al. (2004)
Roptrias (ISCOM); im.	VEG ^{ooc}	ELISA; bio.	Proteção Parcial	Garcia et al. (2005)
β-Glucana; im.	10 ⁷ RH ^T ; im.	RIFI	Sem proteção	Bugni et al. (2008)
DNA GRA1-GRA7; (0, 21); id.	2x10 ³ IPB-G ^{cistos} ; ip.	ELISA; pl; bio; PCR	Resposta imune humoral e celular	Jongert et al. (2008)
Roptrias (Quil-A); (0, 21,42); vn.	10 ³ VEG ^{ooc}	ELISA; bio; pl.	Proteção Parcial; proliferação LLM ^L	Cunha et al. (2012)
ESAs (Freund); (0, 30); sc.	10 ⁷ GJS ^T ; ip.	ELISA; bio; pl.	Proteção Parcial; Resposta imune humoral e celular	Wang et al., (2013)

^TTaquizoítas; ^{ooc}Oocistos; bio: bioensaio; ELISA: ensaio imunoenzimático; hist: exame histopatológico; id: intradérmica; im: via intramuscular; imu: exame imunohistoquímico; ip: via intraperitoneal; ^LLinfócitos de linfonodos mesentéricos; MAT: teste de aglutinação modificado; pl: proliferação linfócitos; PCR: reação em cadeia da polimerase; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; sc: via subcutânea; vn: via nasal; vo: via oral.

Fonte: o próprio autor

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIPECS – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. Desempenho mundial da suinocultura. Relatório Anual ABIPECS, 8 p., 2001.
- ANDRADE, G. M. Q.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; CARELLOS, E. V. M. et al. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 1, 2010.
- AMARAL, V. D. O; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M.M. Estudos preliminares sobre a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma*, por hemaglutinação, em soros de suínos provenientes dos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, Brasil. **Biológico**, v. 41, p. 105-107, 1975.
- AMARAL, V.; MACRUZ, R. *Toxoplasma gondii*, isolamento de amostras a partir de diafragmas de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 47-54, 1969.
- ARAÚJO, F. A.P.; SANTOS, J.R.; SOUZA, W. J. S. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected pigs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the area of great Erechim, RS, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, n. 2, p. 57-65, 1998.
- AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. J; ALVES, C. J. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.2, 2010.
- BARCI, L. A. G.; BERSANO, J. G.; GUIMARÃES, A. C. S. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em plantéis de suínos reprodutores no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.65, n.1, p.111-3, 1998.
- BASSO, W.; HANDKE, M.; SYDLER, T. et al. Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms. **Parasitology International**. v. 64, n.2, p. 157-160, 2014.
- BELFORT, JR .; SILVEIRA, C.; MUCCIOLI C. et al. Incidence of acquired ocular toxoplasmosis seroconversion and clinical course in a prospective study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40 (4 Suppl), p. 383, 1999.
- BEZERRA, R. A.; PARANHOS, E.B.; DEL'ARCO , A. E.; et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 78-80, 2009.
- BHOPALE, G. M. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 457-462, 2003.
- BONENFANT, C.; DIMIER-POISSON, I.; VELGE-ROUSSEL. et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat- labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1605-1612, 2001.

BONNA, I. C. F.; FIGUEIREDO, F. B.; COSTA, T. et al. Estudo soropidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. Resultados da pesquisa. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, p. 186-189, 2006

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.

BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**. v. 13, p. 143-149, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 de outubro de 2011, Seção 1, p. 4 – 11.

BUGNI, F. M.; CUNHA, I. A. L.; ARAÚJO, M. A. et al. Ação da β -glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, Supl. 1, p. 249-259, 2008.

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

BUXTON, D.; UGGLA, U.; LÖVGREN, B. K. et al. Trial of a novel experimental *Toxoplasma* iscom vaccine in pregnant sheep. **British Veterinary Journal**, v. 145, p. 451-457, 1989.

CADEMARTORI, B. G.; SANTOS, L. M. J.; QUEVEDO NETO, P. S. et al. *Toxoplasma gondii*. Diagnóstico sorológico e isolamento em suínos de criação artesanal no sul do Brasil - nota prévia. **The Biologist**, v. 10, n. 2, 2012.

CAPORALI, E. H. G.; SILVA, A. V.; MENDONÇA, A.O. et al. Comparação de métodos para determinação da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos dos Estados de São Paulo e Pernambuco. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, n. 1, p. 19-24, 2005

CARLETTI, R. T.; FREIRE, R. L.; SHIMADA, M. D. et al. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no Estado do Paraná, Brasil. **Sêmina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 563-568, out./dez, 2005

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

CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 863-864, 2006.

CHOI, W. Y.; NAM, H. W.; KWAK, N. H. et al. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **The journal of Infectious Disease**. 175, 1280–1282, 1997.

- COOK, A. J. C.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W. et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: european multicentre case-control study. **British Medical Journal**, v. 321, p. 142–147, 2000.
- CLEMENTINO-ANDRADE, M. M.; PINHEIRO, B. V.; CUNHA, M. M. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brasil. **Research in veterinary Science**, v. 94, p. 587-589, 2013.
- CORREA, F. M. A.; SALATA, E.; OLIVEIRA, M. R. *Toxoplasma gondii*: diagnóstico, pela prova de imunofluorescência indireta em suínos no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 45, p. 209-212, 1978.
- CUNHA, I. A. L.; ZULPO, D. L.; BOGADO, A. L. G. et al. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 216 – 221, 2012.
- D'ANGELINO, J. L.; ISCHIZUKA, M. M. Toxoplasmose suína: Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. **Bol Of Sanit Panam**, v. 100, p. 634-647, 1986.
- DEBARD, N. D.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2158-2166, 1996.
- DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; MARTIN, P. et al. Emergence of NK1.1+ cell as effector of INF- γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I – deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 1465-72, 1993.
- DETANICO, L.; BASSO, R. M. C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 15-18, 2006.
- DIAS, R. A. F., NAVARRO, I. T., RUFFOLO, B. B., et al.. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Parana State, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 185–189, 2005.
- DOS SANTOS, C. B.; CARVALHO, A. C.; RAGOZO, A. M. et al. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 207-211, 2005.
- DUBEY, J. P.; MURRELL, K. D.; FAYER, R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 1941-1943, 1984.
- DUBEY, J. P., LEIGHTY, J. C., BEAL, V. C. et al. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. **International Journal for Parasitology**, v. 77, p. 517–521, 1991.
- DUBEY, J. P.; URBAN, J. F.; DAVIS, S. W. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 1316-1319, 1991.

- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593–1598, 1994.
- DUBEY, J. P.; BAKER, D. G.; DAVIS, S. W. et al. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal Veterinary Research**, v. 55, p. 982-987, 1994.
- DUBEY, J. P.; WEIGEL, R. M.; SIEGEL, A. M. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **International Journal for Parasitology**, v. 81, p. 723–729. 1995.
- DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 65-70, 1996.
- DUBEY, J.P., LUNNEY, J.K., SHEN, S.K. et al. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 749-752, 1998.
- DUBEY, J. P.; THAYER, D. W.; SPEERC, C. A. et al. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 369-375, 1998a.
- DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **The Journal of Parasitology**, v. 87, p. 215–219. 2001.
- DUBEY, J. P.; JONES, J. L.; *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89–103, 2009.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2 ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc., 338 p., 2010.
- DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; ROZEBOOM, D. W. et al. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1-2, p. 14-18, 2012.
- DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counseling. **Lancet**, v. 353, p. 1829-1833, 1999
- EDELHOFER, R. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria—an evaluation of data from 1982 and 1992. **Parasitology Research**, v. 80, p. 642–644, 1994
- FARREL, R. L.; DOCTON, F. L.; CHAMBERLAIN, D. M. et al. Toxoplasmosis: 1. *Toxoplasma* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 13, p. 181-185, 1952.
- FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L.; MELO, L. R. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4; 305-309, 2014.

- FEHLHABER, K., HINTERSDORF, P., KRUGER, G. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs of different management systems and in minced meat. **Fleischwirtschaft**, v. 83, p. 97–99, 2002
- 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**, v. 33, p. 893-897, 2003.
- FIGUEIRO-FILHO, E. A.; LOPES, A. H. A.; SENEFONTE, F. R. A. et al. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27. P. 442–449, 2005.
- FISHER, H-G.; STACHELHAUS, S.; SAHM, M. et al. 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.
- FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; SILVA, R. C. et al. *Toxoplasma gondii* infection in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 333-334, 2009.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in a highly endemic area for human toxoplasmosis in Brazil. **Journal of Parasitology**, Vol. 97, n. 1, p. 44-47, 2011.
- FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. et al. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (ISCOMS). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 388-396, 2003.
- FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P.; RAMOS, O. S. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos sem inspeção em Belém. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1230-1232, 2009.
- 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.
- FRENKEL, J. K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 233-240, 1990.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L. et al. Soroprevalência epidemiologia e avaliação ocular do toxoplasmose humana na área rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Pan American Journal of Public Health**, v. 6, p. 157-163, 1999.
- GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T. et al. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into ISCOM. **Experimental Parasitology** 108, 40-46, 2004.
- GARCIA, J. L.; GENNARI, S.M.; NAVARRO, I.T. et al. 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.; BIAZZONO, L. et al. Protective activity against shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v 145, p. 197-206, 2007.

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

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

GAZZINELLI, R.; XU, Y.; HIENY, S. et al. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 149, n.1, p. 175-180, 1992.

GILBERT, R.E., STANFORD, M.R. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? **British Journal of Ophthalmology**. v. 84, 224–226, 1999.

GLASNER, P. D.; SILVEIRA, C.; KRUSZONMORAN, D. et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**. v. 114, 136–144, 1992.

GRÜNSPAN, E. D.; MOREIRA, W. S.; EDELWEISS, M. I. A. et al. Imunoglobulinas antitoxoplásmicas e retinocoroidite em suínos. **Ciência Rural**, v. 25, p. 261-264, 1995.

GUIMARÃES, A. M.; RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 69-71, 1992.

HALL, S.M. et al. How do Jains get *Toxoplasma* infection? **Lancet**, v. 354, p. 486-487, 1999.

HILL, D. E.; HALEY, C.; WAGNER, B. et al.. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the U.S. swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). **Zoonosis Public Health**, v. 57, p. 53-59, fev. 2010.

HOLLAND, G. N. LX Edward Jackson memorial lecture – ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part 1: epidemiology and course of disease. **American Journal of Ophthalmology**. v. 136, p. 973–988, 2003

HOVE, T.; LIND, P.; MUKARATIRWA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs reared under different management systems in Zimbabwe. Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 231–237, 2005

IGARASHI, M.; KANO, F.; TAMEKUNI, K. et al. *Toxoplasma gondii* evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cysts formation in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 386-392, 2008.

JACOBS, D.; DUBREMETZ, J-F.; LOYENS, A. et al. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 237-249, 1998.

JACOBS, L.; LUNDE, F. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs and man. **Public Health Reports**, v.72, n.10, p.872-882, 1957.

- JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D; WILSON, M. et al. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. **American Journal of Epidemiology**, v.154, n.4, p.357-365, 2001.
- JONGERT, V.; MELKEBEEK, S.; DE CRAEYE, J. et al. An enhanced GRA1—GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. **Vaccine**, v. 26, p. 1025—1031, 2008.
- KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. A purified parasite antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. **The Journal of Immunology**, v. 147, n.10, p. 3501-506, 1991.
- KAWASAKI, P.M.; KANO, F.S.; TAMEKUMI, K. et al. Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 347–354, 2007.
- KIJLSTRA, A.; EISSEN, O.A.; CORNELISSEN, J. et al. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 3165–3169, 2004.
- KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.G.; MUL, M.F. et al. Animal-friendly production systems may cause re-emergence of *Toxoplasma gondii*. **Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 52, p. 119–132, 2004a.
- KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J. et al. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183–190, 2008.
- KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; BOS, A. P. Food safety in free-range and organic livestock systems: risk management and responsibility. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 12, p. 2629-2637, 2009
- KOSKI, V. H. Evaluation of ELISA for the detection of *Toxoplasma* antibodies in swine sera. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 31, p. 413-422, 1990.
- KRINGEL, H.; DUBEY, J. P.; BESHAH, E. CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 55–66, 2004.
- KUMOLOSASI, E.; BONHOMME, A.; BEROCHIA, A. et al. 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.
- LAGO, E. G.; DE CARVALHO, R. L.; JUNGBLUT, R.; DA SILVA, V. B.; FIORI, R. M. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. **Scientia Medica**, v. 19, p. 27-34, 2009.
- LAKE, R., HUDSON, A., CRESSEY, P. Risk profile: *Toxoplasma gondii* in red meat and meat products; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/riskprofiles/Toxoplasmagondii-in-red-meat.pdf>. In: New Zealand Food Safety Authority, pp. 1–33, 2002.

- LIESENFELD, O.; NGUYEN, T.A.; PHARKE, C.; SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1491-1493, 2001.
- LIMA, J. N.; FELÍCIO, P. S.; FRANCO, P. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) em suínos abatidos em matadouros no estado de São Paulo, SP, Brasil. **Biológico**, v. 67, p. 25-51, 2007.
- LUCIANO, D. M.; MENEZES, R. C.; FERREIRA, L. C. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n.4, 2011.
- LUNDE' N, A.; LIND, P.; ENGVALL, E.O. et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v. 34, p. 362–365, 2002.
- MAENZ, M.; SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O. et al. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 39, p. 77-106, 2014
- MANDAI, O. N.; LOPES, F. M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R. Prevalência de anticorpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde do município de Londrina - Paraná, no período de 2003 e 2004. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 247-249, 2007.
- MATOS, M. P. C.; SOBESTIANSKY, J.; GAMBARINI, M. L. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia. **Hora Veterinária**, v. 19, n. 109, p. 9-11, 1999.
- MEERBURG, B.G.; BONDE, M.; BROM, F.W.A. et al. Towards sustainable management of rodents in organic animal husbandry. **Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 52, 195–205, 2004.
- MEERBURG, B.G.; VAN RIEL, J.W.; CORNELISSEN, J.B. et al. Cats and goat whey associated with *Toxoplasma gondii* infection in pigs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 6, p. 266–274, 2006
- METSIS, A.; PETTSERSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 KDa with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology** 81, 472-479, 1995.
- MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T et al. *Toxoplasma gondii*: estudo sorológico-epidemiológico de suínos da região sudoeste do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.15-18, 2008.
- MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal Parasitology** 58, 928-937, 1972.
- MITSUKA-BREGANÓ; R.; LOPES; F. M. R.; NAVARRO, I. T. **Toxoplasmose Gestacional e Congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas** – Londrina: Eduel, 62 p, 2010. ISBN: 978-85-7216-519-8.

- MIURA, A. C. F. **Isolamento e genotipagem de *Toxoplasma gondii* em suínos oriundos de abatedouros**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Seminar**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MURARO, L. S.; CARAMORI JÚNIOR, J. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum and Diamantino, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 254-255, 2010.
- MOURA, A. B.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D. L. et al. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 54-56, 2007.
- MURARO, L. S.; CARAMORI-JÚNIOR, J. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum and Diamantino, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 19, p. 254-255, 2010
- NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N. et al. *Toxoplasma gondii*: Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, Pr. **Semina**, Londrina, v.13, p.15-18, 1992.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau *du gondi*. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 148, 369-372, 1909.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de *Leishmania du gondi*. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris** 147, 736-766, 1908.
- NISHI, S. M. **Efeito da infecção pelo *Toxoplasma gondii* na expressão de genes associados à resposta imune em tecidos de suínos**. 2004. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NOP (NATIONAL ORGANIC PROGRAM). United States Department of Agriculture. 2014. <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/nop>>. Acesso em: 05 jan. 2015.
- OKAMOTO, I.; SUZUKI, Y.; ITOH, H.; FUKUURA, H.; YOKOYAMA, I. A collective outbreak of porcine toxoplasmosis due to supplied feed supplements with *Toxoplasma* oocysts. **Journal of the Japanese Veterinary Medical Association**, v. 42, p. 729-732, 1989.
- O'CONNELL, E.; WILKINS, M. F.; TE PUNGA, W. A. Toxoplasmosis in sheep. II. The ability of a live vaccine to prevent lamb losses after an intravenous challenge with *Toxoplasma gondii*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 36, p. 1-4, 1988.
- OLIVEIRA, K. R.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. et al. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos criados sob condições rústicas na microrregião de Registro – SP, pelo método de aglutinação direta (MAD). **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, p. 169-175, 2007.

PAPPAS, G. N.; ROUSSOS, M. E.; FALAGAS. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1385–1394, 2009.

PATTON, S., ZIMMERMAN, J., ROBERTS, T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in hogs in the National Animal Health Monitoring System (NAHMS). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, p. 121S. 1996.

PATTON, S., DIDERRICH, V., FAULKNER, C., et al. *Toxoplasma gondii* in swine operations in the United States: seroprevalence in sows and market-weight pigs in the national animal health monitoring system, 1995 and an assessment of management factors. **National Pork Board Report**, 1998. Disponível em: <<http://www.pork.org/PorkScience/Documents/ToxoplasmaGondiiinSwine.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2010.

PEZERICO, G. P.; PEZERICO, S. B.; SILVA, R.C. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos em três abatedouros dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 74, p. 267-270, 2007.

PIASSA, F. R.; ARAÚJO, J. B.; ROSA, R. C. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non-certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 153-156, 2010.

PINCKNEY, R.D.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. et al. Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 438-448, 1994.

ROBERTS, T., FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United-States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 249–256, 1990.

ROBERTS, T., MURRELL, K.D., MARKS, S. Economic-losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitology Today**, v. 10, p. 419–423, 1994.

ROGHMANN, M-C.; FAULKNER, C. T.; LEFKOWITZ, A. et al. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 790–792, 1999.

ROOS, D. S.; CRAWFORD, M. J.; DONALD, R. G. et al. Transport and trafficking: *Toxoplasma* as a model for *Plasmodium*. **Novartis Foundation Symposium**, v. 226, p. 176-198, 1999.

ROSA, R. C.; MATTEI, R. J.; SILVA R. C. et al. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados em granjas de elevado e baixo padrão sanitário no noroeste do Paraná. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 4, p. 435-437, 2011.

ROSS, R. D.; STEC, L. A.; WERNER, J. C. et al. Presumed acquired ocular toxoplasmosis in deerhunters. **Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases**. v, 21, p. 226–229, 2001.

ROPPA, L. Evolução do Mercado Mundial de Suínos nos últimos 30 Anos. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS (ABCS). **Produção de Suínos: teoria e prática**, 1. ed. Brasília: ABCS, 2014. p. 23-29.

RYU, J. S.; MIN, D. Y.; AHN, M. H. et al. *Toxoplasma* antibody titers by ELISA and indirect látex agglutination test in pregnant women. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 34, p. 233–238, 1996.

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

SCHENK, M. A. M.; LIMA, J. D.; VIANA, F. C. Frequência da toxoplasmose em suínos abatidos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 28, p. 261-266, 1976.

SILVA I. M. L. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural Estadual de Minas Gerais**, v. 12, p. 425-428, 1959

SILVA, R. A. M. S.; BONASSI, C.; DALLA COSTA, A. O. et al. Serosurvey on pig toxoplasmosis in animals kept in different management systems in Santa Catarina and Rio Grande do Sul States, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 147, 2000.

SILVA, A.V.; BOARETO, H.; ISBRECHT, F. B. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 15, p. 263-266, 2008

SILVEIRA, C.; BELFORT, JR. R.; BURNIER, JR. M. Toxoplasmose ocular. Identificação de cistos de *Toxoplasma gondii* na retina de irmãos não gêmeos com diagnóstico de toxoplasmose ocular recidivante: primeiro caso mundial. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 50, p. 215-218, 1987.

SILVEIRA, C. Toxoplasmose - Levantamento bibliográfico de 1997 a 2000. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 64, p. 263-270, 2001.

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

SOUSA, R. A.; LEMOS, J. F.; FARIAS, L. A. et al. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pigs in southern Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 98-100, 2014.

SPALDING, S.M., AMENDOEIRA, M. R. R.; KLEIN, C. H. et al. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n.2, p.173-177, 2005.

SPEER, C. A.; TILLEY, M; TEMPLE, M. E. et al. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. **Molecular & Biochemical Parasitology** 75, 75-86, 1995.

- SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli: incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uomo. **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.
- STANLEY, A. C.; BUXTON, D.; INNES, E. A. et al. Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. **Vaccine**, v. 22, n. 29-30, p. 3929-3941, 2004.
- STANFORD, M.R., TAN, H.K., GILBERT, R.E. Toxoplasmic retinochoroiditis presenting in childhood: clinical findings in a UK survey. **British Journal of Ophthalmology**. v. 90, 1464-1467, 2006
- STEHLING, A. R.; ORÉFICE, F. Toxoplasmose ocular adquirida (relato de seis casos com aspectos clínicos diferentes). **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 55, p. 455-465, 1996.
- SUARÉZ-ARANDA, F; GALISTEO JR, A.J.; HIRAMOTO, R.M. et al. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v. 91, p. 23-32, 2000.
- TENDER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal Parasitology**, v.30, p.1217-1258, 2000.
- TENTER, A.M., *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(2): 364-369, 2009.
- TSUTSUI, V. S.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L. et al. Soroepidemiologia e fatores associados a transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, p. 27-34, 2003.
- VALENÇA, R, M, B.; MOTA, R. A.; ANDERLINI, G. A. et al. Prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em granjas suínolas tecnificadas no Estado de Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 121-126, 2011.
- VAN DER GIESSEN, J., FONVILLE, M., BOUWKNEGT, M. et al. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 371-374, 2007.
- VASCONCELOS, O. T.; COSTA, A, J.; ÁVILA, F. A. Aspectos epi-demiológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos. **Científica**, v. 7, p. 83-87, 1979.
- VELGE-ROUSSEL, F.; MARCELO, P.; LEPAGE, A. C. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infection and Immunity**, v. 68, n.2, p. 969-972, 2000.
- VERHELSTA, D. ; CRAEYEB, S. DE.; DORNYC, P. IFN- γ expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues are associated with an antibody response against GRA7 in experimentally infected pigs. **Veterinary Parasitology**, in press, 2011.
- VIDOTTO, O., NAVARRO, I.T., GIRALDI, I.T. et al. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina - PR. **Semina**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 1990.

WANG, Y.; ZHANG, D.; WANG, G. et al. Immunization with excreted–secreted antigens reduces tissue cyst formation in pigs. **Parasitology Research**, v. 112, n. 11, p. 3835-3842, 2013.

WASTUNG, J. M.; HARKINS, D.; MALEY, S. et al. Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, p. 53-62, 1995.

WENTZ, I.; SOBESTIANSKY, J.; CHAPLIN, E. Prevalência de anticorpos para toxoplasmose em soros de suínos de pedigree em Santa Catarina. Concórdia. **EMBRAPA Suínos e Aves**; 1988.

ZIMMERMAN, J. J.; DREESEN, D.W.; OWEN, W. J. et al. Prevalence of toxoplasmosis in swine from Iowa. **American Veterinary Medical Association**, v 196, p. 266–270, 1990

ZOU, F-C.; SUN, X-T.; XIE, Y-J. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in Southwestern China. **Parasitology International**, v. 58, p. 306–307, 2009.

ZULPO, D. L.; HEADLEY, S. A.; BIAZZONO, L. et al. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 223–230, 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a resposta imune e a proteção contra a presença do *Toxoplasma gondii* em tecidos de suínos imunizados com proteínas nativas de roptrias e proteína recombinante (rROP2) do *T. gondii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar roptrias do *T. gondii*;
- Produzir proteína recombinante rROP2 do *Toxoplasma gondii*;
- Imunizar suínos com proteínas de roptrias e rROP2 do *Toxoplasma gondii* pelas vias intranasal e intramuscular.
- Avaliar a resposta humoral e celular em suínos imunizados com roptrias do *Toxoplasma gondii*;
- Avaliar a resposta humoral em suínos imunizados com proteína recombinante rROP2 do *Toxoplasma gondii*;
- Avaliar a proteção clínica nos suínos após desafio com oocistos esporulados;
- Avaliar a proteção contra a presença do *T. gondii* nos tecidos após desafio com oocistos esporulados.

3 ARTIGO PUBLICADO**HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES IN PIGS IMMUNIZED
INTRANASALLY WITH CRUDE RHOPTRY PROTEINS OF *Toxoplasma*
gondii PLUS QUIL-A.**

Veterinary Parasitology, v. 186, n. 3–4, Maio de 2012, Páginas 216–221.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhostry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A

Ivo Alexandre Leme da Cunha^a, Dauton Luiz Zulpo^a, Alexey Leon Gomel Bogado^a, Luiz Daniel de Barros^a, Alessandra Taroda^a, Michelle Igarashi^b, Itamar Teodorico Navarro^a, João Luis Garcia^{a,*}

^a Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de Londrina - UEL, Postal Box 6001, 86050-970 Londrina, PR, Brazil

^b Laboratório de Parasitologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Cuiabá, MT, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2011

Received in revised form 2 November 2011

Accepted 8 November 2011

Keywords:

Toxoplasma gondii

Rhostry

Mucosal immunity

Pigs

ABSTRACT

We evaluated the humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhostry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. The experiment used 13 mixed-breed pigs divided into the following three groups: G1 (vaccinated-challenged, $n=6$), which received the rhostry vaccine (200 (g/dose)); G2 (adjuvant-challenged, $n=4$), which received PBS plus Quil-A; and G3 (unvaccinated-challenged, $n=3$), which was the control group. The treatments were performed intranasally at days 0, 21, and 42. Three pigs from G1 produced IgG and IgM antibody levels above the cut-off in the ELISA on the challenge day. Partial protection was observed in G1 at the chronic phase of infection when compared with G3. The preventable fractions were 41.6% and 6.5%, in G1 and G2, respectively. The results of this study suggest that rhostry proteins plus Quil-A stimulated humoral, local, and systemic immune responses, which were able to partially protect the brain from cyst formation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite that can infect humans and warm-blooded animals. Humans can become infected by ingesting raw or undercooked meat containing cysts (Garcia, 2009). The longevity of a tissue cyst in pork can last more than two years (Dubey et al., 1998), and pork is one of the most common sources of *T. gondii* infections in humans (Dubey et al., 1991). These results indicate that developing a vaccine against *T. gondii* in pigs would be desirable to reduce tissue cyst formation.

Live vaccines (RH, T263, and S48) have shown protection against toxoplasmosis (Frenkel et al., 1991; Dubey et al., 1991, 1994), but these carry the risk of reverting to virulence (Supply et al., 1999). A useful *T. gondii* vaccine for human beings and animals needs to be safe (non-infectious), to have a reasonable shelf life, to be usable in pregnant females without infecting the fetuses, to protect against transplacental infection, and to avoid oocyst shedding by cats and tissue cyst formation in animals (Garcia, 2009).

A vaccine study using crude *T. gondii* antigens incorporated into ISCOM subcutaneously in pigs, monitored through a mouse bioassay, did not isolate tissue cysts from vaccinated animals (Freire et al., 2003). Garcia et al. (2005) used rhostry proteins incorporated into ISCOM to prevent tissue cyst formation in pigs challenged with sporulated

* Corresponding author. Tel.: +55 43 33715871; fax: +55 43 33714485.
E-mail address: jl Garcia@uel.br (J.L. Garcia).

oocysts of the VEG strain. The results indicated that the rhoptry vaccine conferred partial protection during the chronic phase of the disease.

Smith et al. (1998) showed that oral administration of free Quil-A together with OVA reproduced most of the local and systemic immune responses obtained with ISCOM and OVA. The saponin adjuvant Quil-A is obtained from the bark of a tree, *Quillaja saponaria*. Quil-A is a widely used veterinary adjuvant that is inexpensive, simple to formulate, and generally safe (Cox and Coulter, 1997). Additionally, QS21, a purified fraction from Quil-A, was used for control of *Plasmodium falciparum* in humans, and the authors described an enhanced in immunogenicity of peptide vaccine (Kashala et al., 2002).

The most common infection route of *T. gondii* is oral ingestion. Therefore, stimulation of a mucosal immune response will be desirable in controlling oral toxoplasmosis (Chardés and Bout, 1993). The intranasal route has been evaluated as an immunization route in pigs, however, these studies tested virus and bacterial immune responses (Yokomizo et al., 2002; Zhang et al., 2007; Neumann et al., 2009). Yokomizo et al. (2002) showed that intranasal immunization is more efficient for inducing local and systemic immunity than oral immunization in pigs.

In the present study, we evaluated humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *T. gondii* plus Quil-A.

2. Materials and methods

2.1. *Toxoplasma gondii* strain

LIV-5 and VEG *T. gondii* strains were used in the experiment. LIV-5 strain was used to obtain rhoptries and VEG strain was used for the pigs challenge. Oocysts from VEG strain were obtained from feces of recently infected cats. After sporulation the oocysts had their virulence tested by mouse infection before pig infection.

2.2. Rhoptries purification

Tachyzoites of LIV-5 strain were obtained from peritoneal fluid of infected Swiss mice. The material was passed three times through a 26 gauge needle to purification and washed twice with 10 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.5). The pellet was resuspended and washed twice in homogenization medium (HM: 250 mM sucrose; 1 mM EDTA; 5 mM triethanolamine-HCl; pH 7.5), after washed, tachyzoites were prepared at a concentration of 10^9 tachyzoites/mL. Cell suspension was disrupted in a French pressure cell at 50 kg/cm^2 . Unbroken cells were sedimented by a 10 min centrifugation at $750 \times g$. Supernatant was centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min to sediment the crude organellar. Final pellet was fractionated by isopycnic sucrose density gradient centrifugation to rhoptries isolation following Garcia et al. (2004). Briefly, the final pellet was resuspended in 4 mL of HM, layered onto a 6 mL preformed continuous 1.0–1.6 M sucrose gradient and centrifuged overnight at $72,000 \times g$. Sub-fractions were collected from each visible gradient fraction, suspended in 10 mL of HM, and pelleted by centrifugation $120,000 \times g$

for 1 h. Fraction 3 (1.4 M and a density of 1.17 g/cm^3) showed rhoptries (Garcia et al., 2004) and was used to vaccinated the animals. From one hundred mice infected with *T. gondii* LIV-5 we collected 300 mL of peritoneal fluid with 3×10^7 tachyzoites/mL and obtained 4600 μg of rhoptry proteins in a total volume of 2 mL. Protein concentration in each sub-fraction was determined using the bicinchoninic acid technique (BCA Protein Assay Reagent, Pierce).

2.3. Vaccination and challenge of pigs

2.3.1. Animals

The maintenance and care of experimental animals complied with the Animal Ethic Committee from Universidade Estadual de Londrina (CEEA 17/09). Thirteen mixed breed pigs between 6.5- and 7.5-week-old, including females and castrated males, were randomly allocated in separate stables (2 for 2). The animals were left to acclimatize for 6 days before we began the experiment. They received food and water ad libitum. All pigs were serum negative (titre < 64) in the *T. gondii* indirect immunofluorescence assay (IFA).

2.3.2. Vaccination and challenge

The pigs were divided into 3 groups, group 1 (G1, $n=6$), group 2 (G2, $n=4$) and group 3 (G3, $n=3$). The G1 received 200 μg of rhoptry proteins plus Quil-A (50 μg) by nasal route (NA) at days 0, 21, and 42 of the experiment. The G2 and G3 received just Quil-A (50 μg) and PBS by nasal route, respectively. At challenge day (day 49) two animals from G1 were euthanatized for lymphocytes proliferation assay, and the other animals from G1 ($n=4$), G2 ($n=4$) and G3 ($n=3$) were challenged with 10^3 oocysts of VEG strain by oral route.

2.3.3. Sampling and measurements

Clinical signs and body temperatures were recovered before and after challenge. Serum samples were obtained at days -6, 0, 21, 42, 49, 64, 79 and at slaughter (day 94) and stored at -20°C . At death, brain samples were collected to investigate *T. gondii* tissue cysts by mouse bioassay.

2.3.4. Immunofluorescence assay (IFA)

The presence of antibodies against *T. gondii* in serum samples of pigs (before of experiment to select the animals) and mice were measured by indirect immunofluorescence assay (Camargo, 1974) considering as positive pigs with titre ≥ 64 and mice with titre ≥ 16 (Garcia et al., 2005).

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG, and IgM

Flat-bottom 96 well polystyrene microtitration plates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Denmark) were coated with 0.1 mL of the rhoptry antigens (5 μg /well) diluted in 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) and incubated overnight at $+6^\circ\text{C}$ as described by Garcia et al. (2005). The plates were washed 3 times with PBS-tween 20 (50 mM tris, pH 7.4, containing 150 mM sodium chloride and 0.05% tween 20) and non-specific immune sites blocked by incubation for

1 h at 37 °C with carbonate buffer –8% nonfat dry milk. The control sera and test sera were diluted 1:200 in PBS-tween 20–5% nonfat dry milk and added to the microtitre plates in duplicate, 0.1 mL in each well, and incubated for 1 h at 37 °C. The positive and negative control sera were included in each plate. After washing, peroxidase-labeled anti-pig IgG and IgM antibody (Bethyl Laboratories Inc., diluted 1:2500 in PBS-tween 20–5% nonfat dry milk) was added 0.1 mL in each well and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, the peroxidase activity was revealed by adding 0.1 mL of ortho-phenylenediamine solution (40 mg ortho-phenylenediamine/100 mL of 0.1 M phosphate citrate buffer, pH 6.0, and 40 μ L of H₂O₂), and the reaction was stopped by adding 0.05 mL of 1 N HCL, and the optical density (OD) was read at 490 nm in an ELISA microplate reader. For control of plate-to-plate variation, the same positive and negative control sera were included on every plate and a corrected OD value was calculated for each sample as described previously by Garcia et al. (2006). A serum was considered to be positive when OD testes serum > [OD mean (from negative sera obtained from all plates, $n=15$)+2 SD (standard deviation from negative serum from all plates)].

2.5. Lymphocyte proliferation

The proliferation assays of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and lymphocytes from mesenteric lymph nodes (MLN) were performed as previously described (Solano-Aguilar et al., 2000). Two pigs from G1 were euthanized at challenge day. Whole blood was obtained by venipuncture in EDTA vacutainers and mixed 1:2 with phosphate-buffered saline (PBS), and MLN were collected from ileum and jejunum into 50-mL conical tubes and kept in collection media (CM) at 4 °C. Cells from MLN were release by sharp scissors into a petri dish containing RPMI 1640 medium (GIBCO), and then the cell suspension were filtered. PBMC were isolated by density gradient centrifugation by using lymphocyte separation media (LSM). The isolated cells were washed twice in RPMI 1640 medium. The cell suspensions from PBMC and MLN were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% bovine fetal serum, L-glutamine (2 mM; BioWhittaker), sodium pyruvate (1 mM; Sigma), and penicillin–streptomycin (1 mM; Sigma). The suspensions were then seeded in triplicate at 10⁶ cells per well into flat-bottomed 96-well microtiter plates (Costar) with 200 μ L of culture medium that contained 5, 10, and 15 μ g of rhoptry proteins per mL. Phytohemagglutinin-M (Sigma) at 10 μ g/per mL was then added to the culture medium and served as positive control for proliferation; while medium without additives were used as the negative controls. The plates were incubated in 5% CO₂ at 37 °C for 64 h. The viability of the cells was higher than 90% as determined by trypan blue exclusion. The cellular proliferation was determined by Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). The absorbance determination at 570 nm was realized by using a microplate reader; proliferation was expressed as stimulation indices (SI= ratio of the mean proliferation of the cells after stimulation relative

to the proliferation of unstimulated control cells from the same animal).

2.6. Bioassay of pig brains for *T. gondii*

Brain samples (50 g) from each pig were used to evaluate the presence of *T. gondii* cysts as described previously (Dubey, 1998). Briefly, each sample was homogenized in a blender for 30 s in 250 mL of saline solution (0.14 M NaCl). After homogenization 250 mL of pepsin solution (50 g) was added and incubated at 37 °C for 1 h. The homogenate was filtered through 2 layers gauze and centrifuged at 1180 \times g for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment was resuspended in 20 mL PBS (pH 7.2) and 15 mL 1.2% sodium bicarbonate (pH 8.3) was added and centrifuged at 1180 \times g for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment was resuspended in 5 mL of antibiotic saline solution (1000 U penicillin and 100 μ L of streptomycin/mL of saline solution) and inoculated subcutaneously into 3 mice (1 mL/mouse).

2.7. Examination of mice

Impression smears of lung from the mice that died were fixed in methanol, stained with Giemsa, and examined microscopically. Blood samples were drawn from the mice that survived 45 days after post-inoculation, and the brain of each mouse was examined microscopically for *T. gondii* tissue cysts by squashing a portion of brain between a coverslip and a glass slide. Serum from each mouse was diluted at 1:16 and 1:64 and examined for *T. gondii* antibodies, using IFA.

2.8. Statistical analyses

Qui-square was used to show statistical difference in mice bioassay. Protection against tissue cysts formation in pigs was evaluated by estimating preventable fraction (PF) as previously described (Siev, 1994) with some adjustments; $PF = (p2 - p1)/p2$, where $p2 = \%$ of positive mice from pigs from G3 and $p1 = \%$ of positive mice from pigs from G1 or G2. The statistical evaluation of the lymphocyte proliferation data was performed using the Student's *t*-test.

3. Results

There were no clinical symptoms of toxoplasmosis in pigs after the challenge (ac), except for a fever on days 6–8 ac (>40.0 °C, Fig. 1).

IgG and IgM antibody results are shown in Fig. 2. The average antibody levels at the challenge in the immunized group (G1) were IgG OD mean = 0.222 \pm 0.229 and IgM OD mean = 0.445 \pm 0.215. Three animals from G1 had IgG and IgM antibody levels above the cut-off on the challenge day (ODIgG = 0.195, IgM OD mean = 0.376). Animals from G2 and G3 remained IgG and IgM negative before the challenge. All pigs from G1, G2, and G3 seroconverted after the challenge. The IgM antibody levels had a downward tendency after the challenge day, and some animals were negative.

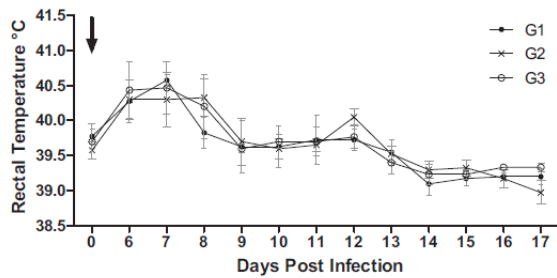


Fig. 1. Rectal temperatures of the pigs from G1, G2 and G3. Temperatures are expressed as mean ± SEM. On the day 0 (day 49 of the experiment) all animals were challenged (black arrow) with 10³ oocysts of the *T. gondii* VEG strain.

The proliferation assays of lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and mesenteric lymph nodes (LMLNs) elicited lymphocyte proliferation response (Fig. 3), however, the proliferation was higher in LMLNs than PBMCs.

The results of the bioassay are summarized in Table 1. Mouse bioassays of pig brains in G1, G2, and G3 animals were positive: 5/11 (45.4%), 8/11 (72.7%), and 7/9 (77.8%). The preventable fraction (PF) was 41.6% and 6.5% in G1 and G2, respectively. One pig from G1 did not have brain cysts detected through the mouse bioassay; however, all pigs from G2 and G3 did have brain cysts.

4. Discussion

In the present study, we observed that intranasal immunization with rhoptry proteins of *T. gondii* did not stimulate all pigs to produce serum IgG and IgM antibodies, however, the animals from G1 showed a partial protection against tissue cyst burden. This is a particularly significant finding, as it indicates that subunit vaccine for *T. gondii* could be differentiated from natural infection (Garcia, 2009). This could be important for future vaccination protocol for prevent *T. gondii* in negative dams, including pregnant women. Additionally, the lack of correlation between circulating antibodies and intestinal immunity was described previously (Dubey and Frenkel, 1972). Frenkel and Smith (1982)

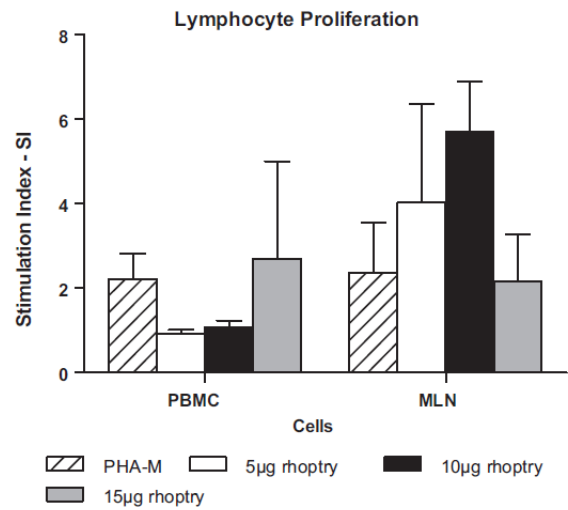


Fig. 3. Lymphocyte proliferation response from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and mesenteric lymph nodes (MLNs) from G1 (two animals) at challenge day (day 49). The lymphocyte stimulation was performed using 5, 10 and 15 µg of *T. gondii* rhoptries and the positive control stimulated with 1% of Phytohemagglutinin (PHA-M).

observed that immunity in the absence of antibodies was reached, especially in cats treated with monesin (2/7) and sulfadiazine (3/4), and the central focus of immunity to oocyst shedding appears to be intestinal epithelium of kittens (Frenkel et al., 1991).

Herein, lymphocyte responses were observed in the blood and intestine of pigs (G1), but the proliferation was higher in LMLNs than PBMCs. This could explain why G1 animals showed a higher PF (41.6%) than did G2 animals (6.4%), including one G1 animal that did not show brain cysts. Pork is considered the most common infection source of *T. gondii* for human beings in the USA (Dubey, 2009); therefore, a *T. gondii* vaccine for pigs should prohibit the formation of tissue cysts (Garcia, 2009). Most of studies about the immune response to *T. gondii* were done in murine models, however, studies using pigs as *T. gondii* model are important because there are some differences

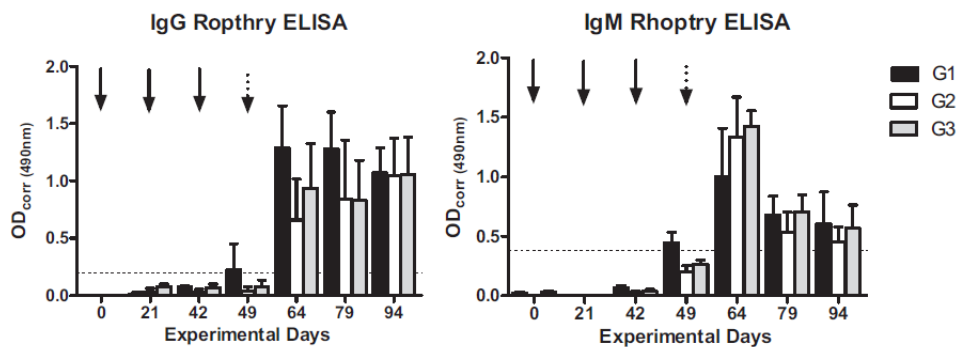


Fig. 2. IgG and IgM antibody responses measure by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from pigs of the G1, G2 and G3 (bars = OD mean from animals, and error bars = standard deviation). The G1 was vaccinated with *T. gondii* rhoptry vaccine, G2 received PBS plus Quil-A, and G3 received only saline. The treatments were performed by nasal route at days 0, 21 and 42 (black arrows). At day 49 all groups received a challenge route of the 10³ oocysts of the *T. gondii* VEG strain (dashed arrow) and at day 94 all animals were slaughtered. Dashed line indicates positive cut-off.

Table 1Outcome of *Toxoplasma gondii* mouse bioassay performed from pig brains after treatments and challenged with oocysts of VEG strain.

Group/pig no.	Sex ^a	Immunization PID ^b			Challenge PID	Bioassay of brain PID	
		0	21	42		49	Results ^d
G1							
1	M		Rhoptry (200 µg)			0(1)/3	
2	F		+		10 ³ oocysts	2/2 ^g	
3	F		Quil-A (50 µg)		VEG	0(0)/3	25/54.5/41.6
4	M		NA ^c			2(0)/3	
G2							
5	F					3/3	
6	F		Quil-A (50 µg)		10 ³ oocysts	0(1)/3	
7	F		NA		VEG	0(2)/3	0/27.2/6.5
8	M					2/2 ^g	
G3							
9	F		Saline		10 ³ oocysts	0(2)/3	
10	F		NA		VEG	3/3	0/22.2/NE ^f
11	F					0(2)/3	

^a M: male; F: female.^b PID: post inoculation day.^c NA: nasal route.^d Results are expressed as number of mice positive for *T. gondii* from three mice inoculated with pig brains. Numbers in parenthesis indicate the number of mice with antibody titers 16 (IFA), but in which tachyzoites or cysts were not seen in their lung, peritoneal liquid, and brain, respectively; tachyzoites or tissue cysts were seen in the other mice.^e Preventable fraction (PF) was calculated from each group.^f Not evaluated.^g One mice died due to bacterial contamination.

in susceptibility, and immune mechanisms when compare to mice (Dawson et al., 2005).

Clinical signs after *T. gondii* infection in pigs depend on the breed and age of the animals, stage of the parasite, method of administration of parasite, and the number of infective parasites (Jungersen et al., 1999). No clinical symptoms were observed, except for a rise in temperature occurring 5–8 days after challenge. Using the same strain (VEG) and number of oocysts to infect swine, Solano Aguilar et al. (2001) observed death caused by severe fibronectin enteritis in 3 animals 10, 11, and 12 days after infection, however, these authors used miniature swine.

More recently, pigs were immunized intradermally with a DNA vaccine cocktail that encodes GRA1 and GRA7 dense granule proteins (Jongert et al., 2008). The authors found that this vaccine was able to elicit strong humoral and Type 1 cellular immune responses in those animals. The results evaluating tissue cyst showed that two out of three pigs vaccinated did not have the parasite detected in heart.

In conclusion, we observed that nasal immunization with crude rhoptry proteins of *T. gondii* in pigs, using Quil-A as an adjuvant, was able to stimulate a strong response in LMLNs and partially protect animals from brain cyst formation.

Acknowledgements

The present article was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grants No. 561893/2008-0, and 579843/2008-4). J.L. Garcia is recipient of CNPq fellowship.

References

- Camargo, M.E., 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev. Bras. Patol. Clin. 10, 143–171.
- Chardés, T., Bout, D., 1993. Mucosal immune response in toxoplasmosis. Res. Immunol. 144, 57–60.
- Cox, J.C., Coulter, A.R., 1997. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. Vaccine 15, 246–256.
- Dawson, H.D., Beshah, E., Nishi, S., Solano-Aguilar, G., Morimoto, M., Zhao, A., Madden, K.B., Ledbetter, T.K., Dubey, J.P., Shea-Donohue, T., Lunney, J.K., Urban Jr., J.F., 2005. Localized multigene expression patterns support an evolving th1/th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. Infect. Immun. 73, 1116–1128.
- Dubey, J.P., Frenkel, J.K., 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J. Protozool. 19, 155–177.
- Dubey, J.P., Urban, J.F., Davis, S.W., 1991. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. Am. J. Vet. Res. 52, 1316–1319.
- Dubey, J.P., Baker, D.G., Davis, S.W., Urban, J.F., Shen, S.K., 1994. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. Am. J. Vet. Res. 55, 982–987.
- Dubey, J.P., 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. Vet. Parasitol. 74, 75–77.
- Dubey, J.P., Lunney, J.K., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., 1998. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Parasitol. 84, 749–752.
- Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in pigs—the last 20 years. Vet. Parasitol. 164, 89–103.
- Freire, R.L., Navarro, I.T., Bracarense, A.P.F.R.L., 2003. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (iscoms). Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 55, 388–396.
- Frenkel, J.K., Pfefferkorn, E.R., Smith, D.D., Fishback, J.L., 1991. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. Am. J. Vet. Res. 52, 759–763.
- Frenkel, J.K., Smith, D.D., 1982. Immunization of cats against shedding of *Toxoplasma* oocysts. J. Parasitol. 38, 744–748.
- Garcia, J.L., Gennari, S.M., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Sinhorini, I.L., 2004. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. Exp. Parasitol. 108, 40–46.
- Garcia, J.L., Gennari, S.M., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Sinhorini, I.L., Freire, R.L., Marana, E.R., Tsutsui, V., Contente, A.P., Begale, L.P., 2005. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Vet. Parasitol. 129, 209–217.

- Garcia, J.L., Navarro, I.T., Vidotto, O., Gennari, S.M., Machado, R.Z., da Luz Pereira, A.B., Sinhorini, I.L., 2006. *Toxoplasma gondii*: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113, 100–105.
- Garcia, J.L., 2009. Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. *Exp. Rev. Vaccines* 6, 215–225.
- Jongert, V., Melkebeek, S., De Craeye, J., Dewit, J., Verhelst, D., Cox, E., 2008. An enhanced Gra1–Gra7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. *Vaccine* 26, 1025–1031.
- Jungersen, G., Jensen, L., Riber, U., Heegaard, P.M., Petersen, E., Poulsen, J.S., Bille-Hansen, V., Lind, P., 1999. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *Int. J. Parasitol.* 29, 1307–1319.
- Kashala, O., Amador, R., Valero, M.V., Moreno, A., Barbosa, A., Nickel, B., Daubenberger, C.A., Guzman, F., Pluschke, G., Patarroyo, M.E., 2002. Safety, tolerability and immunogenicity of new formulations of the *Plasmodium falciparum* malaria peptide vaccine SPf66 combined with the immunological adjuvant QS-21. *Vaccine* 20, 2263–2277.
- Neumann, E.J., Grinberg, A., Bonistalli, K.N., Mack, H.J., Lehrbach, P.R., Gibson, N., 2009. Safety of a live attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine for swine. *Vet. Microbiol.* 135, 297–303.
- Siev, D., 1994. Estimating vaccine efficacy in prospective studies. *Prev. Vet. Med.* 20, 279–296.
- Smith, R.E., Donachie, A.M., Mowat, A.M., 1998. Immune stimulating complexes as mucosal vaccines. *Immunol. Cell Biol.* 76, 263–269.
- Solano-Aguilar, G.I., Vengroski, K.G., Beshah, E., Vengroski, K.G., Lunney, J.K., 2000. Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *J. Immunol. Methods* 241, 185–199.
- Solano Aguilar, G.I., Beshah, E., Vengroski, K.G., Zarlenga, D., Jau-regui, L., Cosio, M., Douglass, L.W., Dubey, J.P., Lunney, J.K., 2001. Cytokine and lymphocyte profiles in miniature swine after oral infection with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int. J. Parasitol.* 31, 187–195.
- Supply, P., Sutton, P., Coughlan, S.N., Bilo, K., Saman, E., Trees, A.J., Cesbraun-Delauw, M.F., Locht, C., 1999. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 17, 705–714.
- Yokomizo, Y., Watanabe, F., Imada, Y., Inumaru, S., Yanaka, T., Tsuji, T., 2002. Mucosal immunoadjuvant activity of the log toxic recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin produced by *Bacillus brevis* for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 291–300.
- Zhang, L., Tian, X., Zhou, F., 2007. Intranasal administration of CpG oligonucleotides induces mucosal and systemic Type 1 immune responses and adjuvant activity to porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine in piglets in vivo. *Int. Immunopharmacol.* 7, 1732–1740.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM SUÍNOS IMUNIZADOS COM PROTEÍNA RECOMBINANTE (rROP2) DO *Toxoplasma gondii* ASSOCIADA AO ISCOMATRIX.

RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM SUÍNOS IMUNIZADOS COM PROTEÍNA RECOMBINANTE (rROP2) DO *Toxoplasma gondii* ASSOCIADA AO ISCOMATRIX.

4.1 RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório que acomete todos os animais homeotermos e o homem. A carne suína contendo cistos é considerada uma das mais importantes vias de transmissão ao ser humano. A vacinação dos animais domésticos, objetivando a redução do número de cistos teciduais, pode ser uma das estratégias para o controle do *T. gondii*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta imune humoral em suínos imunizados, pelas vias intranasal e intramuscular, com proteínas recombinantes rROP2 do *T. gondii* em combinação com o adjuvante ISCOMATRIX. Foram utilizados 12 suínos mestiços, divididos em três grupos, G1 (n=4) receberam proteínas recombinantes ROP2 do *T. gondii* (200 µg) associadas ao ISCOMATRIX, G2 (n=4) e G3 (n=4) receberam ISCOMATRIX e PBS, respectivamente. Todos os tratamentos foram administrados pela via nasal nos dias 0, 14, 28, 42, 56 e 72 e pela via intramuscular nos dias 86, 93 e 100. No dia 110 todos os animais foram desafiados com 4×10^4 oocistos infectantes da cepa VEG. Os animais foram examinados diariamente quanto a alterações clínicas. A imunidade humoral (IgG, IgM e IgA) foi avaliada semanalmente utilizando o Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). A presença de *T. gondii* no sangue e tecidos (língua, masseter, coração e diafragma) foi avaliada pela técnica de bioensaio em camundongos. Os sinais clínicos observados em todos os animais foram hipertermia ($>40,0^\circ\text{C}$) do terceiro ao sétimo dia pós desafio (DPD), com picos no quarto DPD ($41,1 \pm 0,569$) e no quinto DPD ($41,0 \pm 0,569$), anorexia e prostração no quinto DPD em todos os animais. Todos os animais do G1 produziram anticorpos (IgG, IgM e IgA) acima do ponto de corte, no dia do desafio ($\text{DO}_{\text{média}} \text{IgG} = 0,893 \pm 0,132$, $p < 0,001$; $\text{DO}_{\text{média}} \text{IgM} = 0,778 \pm 0,544$, $p < 0,05$; $\text{DO}_{\text{média}} \text{IgA} = 0,895 \pm 0,0368$, $p < 0,05$). Animais do G2 e G3 permaneceram com títulos abaixo do ponto de corte antes do desafio. Após o desafio foi observado produção de altos títulos de anticorpos produzidos nos animais imunizados e soro conversão observada em nove dias pós desafio nos animais do grupo controle. Foi encontrada proteção parcial contra a presença do *T. gondii* nos tecidos com fatores de proteção calculados em 40,0% e 6,1%, no G1 e G2, respectivamente, comparados com o G3. Como conclusão, houve estímulo total da resposta imune humoral, com produção de altos títulos de anticorpos para IgG e IgA e proteção parcial contra presença de *T. gondii* nos tecidos.

Palavras chave: *Toxoplasmose*; roptrias; vacina, suínos.

HUMORAL IMMUNE RESPONSES IN PIGS IMMUNIZED WITH RECOMBINANT PROTEINS (rROP2) OF THE *Toxoplasma gondii* PLUS ISCOMATRIX

4.2 ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that affects all warm-blooded animals and humans. Pork meat containing tissue cysts is considered one of the most important routes of transmission to humans. Vaccination of domestic animals, aiming at reducing the number of tissue cysts, may be one of the strategies for the control of *T. gondii*. The aim of this study was to evaluate the humoral immune response in pigs immunized intranasally and intramuscularly with recombinant proteins rROP2 of *T. gondii* in combination with the adjuvant ISCOMATRIX. The experiment design used 12 mixed breed pigs divided into three groups, G1 (vaccinated-challenged, n=4) received recombinant ROP2 proteins (200µg/ dose), G2 (adjuvant-challenged, n=4) received PBS plus Quil-A, and G3 (unvaccinated-challenged, n=3) was considered control group. The treatments were performed at days 0, 14, 28, 42, 56 e 72 by intranasal route and days 86, 93 e 100 by intramuscular route. On day 110 all animals this study were challenged with 4×10^4 infective oocysts of the VEG strain. The animals were examined daily for clinical signs. The humoral immune response (IgG, IgM and IgA) were evaluated weekly by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The presence of *T. gondii* in blood and tissues (tongue, masseter muscle, heart and diaphragm) was assessed by bioassay in mice. The clinical signs observed in all animals were fever ($> 40.0^\circ\text{C}$) of the third to seventh day post inoculation (DPD), with peaks in the fourth DPD (41.1 ± 0.569) and fifth DPD (41.0 ± 0.569), anorexia and prostration the fifth DPD in all animals. All the animals of G1 produced antibodies (IgG, IgM and IgA) above the cut-off point on the day of challenge ($\text{OD}_{\text{Mean}} \text{IgG} = 0.893 \pm 0.132$, $p < 0,001$; $\text{OD}_{\text{Mean}} \text{IgM} = 0.778 \pm 0.544$, $p < 0,05$; $\text{OD}_{\text{Mean}} \text{IgA} = 0.895 \pm 0,368$, $p < 0,05$). The G2 and G3 remained with titles below the cut-off point before the challenge. After the challenge was observed production of high titers of antibodies produced in the immunized animals and seroconversion observed in nine days after challenge in the animals from control group. Partial protection against parasitemia and tissue cysts formation was observed in G1 compared to G3. The protection factors were 40.0% and 6.1% in G1 and G2, respectively, compared to G3. In conclusion, there was total stimulation of humoral immune response with high production of antibodies to IgG and IgA and Partial protection against parasitemia and tissue cysts formation.

Keywords: *Toxoplasmosis*; rhoptry; vaccine; pigs.

4.3 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita que pode infectar os seres humanos e todos os animais homeotérmicos. O fato de que os cistos podem permanecer viáveis na musculatura dos suínos infectados por dois anos (DUBEY, 2010) e não serem detectáveis ao abate torna este alimento uma das principais fontes de infecção para os seres humanos (DUBEY, 2009) quando ingerido cru ou mal cozido (GARCIA et al., 1999).

A vacinação dos animais domésticos pode ser uma das estratégias para o controle do *T. gondii*, objetivando a redução do número de cistos teciduais em suínos, podendo diminuir o risco da infecção ao homem pela ingestão de cistos em carnes cruas ou mal cozidas (DUBEY, 1996).

Vacinas contendo proteínas do *T. gondii* que são expressas nos três estágios infectantes do parasita (esporozoíto, taquizoíto e bradizoíto) são de fundamental importância para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (SPEER et al., 1995; GARCIA et al., 2004). As proteínas ROP2 do *T. gondii* são responsáveis pela invasão, replicação e interação célula parasita- hospedeiro, servem como ligação molecular entre a mitocôndria da célula hospedeira e a membrana do vacúolo parasitóforo (NAKKAR et al., 2003) e são encontradas em todos os subgrupos (I, II e III) e em todos os estágios do parasita (EL HAJJ et al., 2006).

Por essas razões, a proteína ROP2 do *Toxoplasma gondii* foi identificada como candidata à vacina (GARCIA et al., 2014) e seu uso como imunógeno foi avaliado em diversos estudos envolvendo camundongos, obtendo resposta imune humoral e celular e redução na formação de cistos teciduais (VERCAMMEN et al., 2000; MARTIN et al. 2004; IGARASHI et al., 2008; DZIADEK et al., 2009, 2011, 2012; IGARASHI et al. 2010; SANCHEZ et al., 2011) e em gatos, objetivando a redução da eliminação de oocistos (ZULPO, 2014). No entanto, embora esses resultados tenham sido promissores em estratégias de imunização em camundongos e gatos, não existem estudos sobre a imunização em suínos com proteínas recombinantes ROP2 para proteção contra a infecção e formação de cistos teciduais pelo *T. gondii*.

O uso de vacinas com proteínas recombinantes tem demonstrado menos reações adversas comparadas com vacinas convencionais, no entanto, sua atividade imunogênica é reduzida (SINGH; O'HAGAN, 2002). Assim, vacinas de subunidade geralmente necessitam de um adjuvante para a produção de uma resposta imune adequada contra um patógeno (PETROVSKY, 2004). Adjuvantes Imunoestimulantes (ISCOMs e ISCOMATRIX) são complexos coloidais estáveis de adjuvante Quil A (saponina obtida da

planta *Quillaja saponária*), colesterol e fosfolipídios e tem sido utilizado na elaboração de vacinas de subunidades, demonstrado habilidade em induzirem alta resposta imune humoral e celular para vários antígenos, em diferentes espécies animais (MOREIN et al., 1984; HU, K-F; LÖVGREN-BENGTSSON, K; MOREIN, B., 2001; FREIRE et al., 2003; GARCIA et al., 2005; DRANE, D.; PEARSE, M. 2006; KAWASAKI et al., 2007; SUN, H-X.; XIE, Y.; YE, Y-P., 2009; GASPARINI et al., 2013).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta imune humoral e a proteção contra a presença do *Toxoplasma gondii* em tecidos de suínos imunizados, pelas vias intranasal e intramuscular, com proteínas recombinantes rROP2 do *T. gondii* em combinação com o adjuvante ISCOMATRIX.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Animais

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais no presente trabalho foram submetidos para a apreciação, avaliação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa instituição – (CEUA 17/09)

Foram utilizados camundongos albinos fêmeas entre 45 a 60 dias (25 – 40g) para obtenção de taquizoítos e cistos teciduais do *Toxoplasma gondii* e para o bioensaio e avaliação da infectividade dos oocistos, dois gatos (*Felis catus*) com seis meses de idade para obtenção de oocistos e doze suínos cruzados (Landrace x Large White) entre 25 e 30 dias de idade, incluindo fêmeas e machos castrados para o estudo das imunizações.

Todos os animais selecionados apresentaram, antes do experimento, sorologia negativa para *T. gondii* (título < 1:16), pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CAMARGO, 1973).

4.4.2 Cepas do *Toxoplasma gondii*

Foram utilizadas no presente trabalho as amostras das cepas RH (SABIN et al., 1941) e VEG (DUBEY et al., 1996) do *T. gondii*. A cepa RH foi utilizada para extração do DNA e incorporação em vetores plasmidial e em vetores para expressão das proteínas recombinantes, além da utilização na produção do antígeno para realização da reação de

Imunofluorescência Indireta (IFI). A amostra VEG foi utilizada para infecção dos felinos para obtenção de oocistos esporulados e posterior desafio dos suínos.

4.4.3 Obtenção das Formas Infectantes do *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos da amostra RH de *T. gondii* foram inoculados em camundongos, pela via intraperitoneal, com uma suspensão de taquizoítos vivos (10^5 / ml) em solução fisiológica estéril. Quarenta e oito horas após a inoculação foi obtido o exsudato por lavagem da cavidade peritoneal com 3 ml de solução fisiológica estéril. Para a purificação dos taquizoítos as amostras foram passadas duas vezes em agulha de 27G (13 x 0,3), para remoção de possíveis células do hospedeiro. Uma vez purificadas, as amostras foram centrifugadas a 1250 x g, três vezes, em tampão fosfato-salina (PBS) (137 mM NaCl; 10 mM Fosfato; pH 7,2) e o sedimento padronizado em 10^9 taquizoítos/ ml por contagem em câmara de Neubauer (GARCIA et al., 2004).

Para obtenção de cistos da amostra VEG, 20 camundongos foram inoculados com 50 cistos da cepa VEG pela via oral e procedido a eutanásia seis semanas após a inoculação. Os cistos foram obtidos do cérebro e quantificados, segundo metodologia descrita por Igarashi et al. (2008). Os cérebros foram coletados e homogeneizados em 1 ml de PBS (pH 7,2) e calculada a média do número de cistos encontrados em quatro amostras (25 μ l cada) por cérebro, usando microscopia ótica. Posteriormente foram utilizados para a infecção dos felinos para produção de oocistos.

Os oocistos da cepa VEG foram obtidos pela infecção de dois gatos (*Felis catus*) com seis meses de idade e sorologicamente negativos para *T. gondii* com aproximadamente 600 cistos da cepa VEG (em um volume de 2 ml) pela via oral, através de sonda estomacal, após serem anestesiados com tiletamina e zolazepam (Zoletil®, Virbac-Brasil, 3,15 mg / kg / IM) (GARCIA et al., 2007).

Durante 20 dias após a infecção as fezes de cada felino foram coletadas e examinadas microscopicamente para verificação de oocistos (GARCIA et al., 2007). As fezes coletadas ao longo de 24 h foram diluídas em um pequeno volume de água destilada e 1 g desse material foi misturado com 9 mL de solução de sacarose (densidade específica de 1,18), filtrada e centrifugadas (1200xg; 10 min.). A presença ou ausência de oocistos foi verificada em microscópio óptico, colocando-se 25 μ l do menisco entre lâmina e lamínula, em duplicata. Quando os oocistos foram detectados no sobrenadante, o conteúdo foi recolhido e diluído em 40 mL de água destilada, e posteriormente centrifugado por duas vezes (750 x g ; 10 min.). O

sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1ml de solução fisiológica estéril e verificado número de oocistos por contagem em câmara de Neubauer (ZULPO et al. 2012).

Os oocistos foram esporulados (2% H₂SO₄; 7 dias; 25°C) e estocados (2% H₂SO₄; 4°C). Antes do uso, foram neutralizados (3,3% NaOH) centrifugado por duas vezes (750 x g ; 10 min.) (DUBEY et al., 1996). O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1ml de solução fisiológica estéril e procedido a contagem em câmara de Neubauer. A infectividade dos oocistos da cepa VEG foi avaliada por inoculação três em camundongos com 50 oocistos, segundo metodologia descrita por Dubey (1997) com algumas modificações.

4.4.4 Obtenção das Proteínas Recombinantes

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

4.4.4.1 Construção dos plasmídeos

A sequência de DNA do gene que codifica o antígeno de ROP2 do *Toxoplasma gondii* foi obtido no banco de dados Genbank (número de acesso: Z36906). O DNA genômico de *T. gondii* foi isolado de taquizoítos da cepa RH e foi usado como molde para a amplificação do gene ROP2 usando protocolo de PCR convencional. O produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O antígeno ROP2 (nt 1022-2125) tem uma massa molecular de 54 kDa. O quadro de leitura ROP2 foi amplificado utilizando as sequencias iniciadoras ROP2F (5'ATCGAATTCACGGATCCTGGAGAC3'- introduzido local de reconhecimento de *EcoRI*, sublinhado) e ROP2R (5'TGAAAGCTTTCATGCCGGTTCTCC3'- introduzido o local de reconhecimento *Hind III*, sublinhado) por um ensaio de PCR. O produto da PCR foi obtido com 1103 pb. O fragmento foi digerido durante uma noite com endonucleases *EcoRI* e *HindIII* e ligado em pTrcHis B (Invitrogen, Life Technologies, EUA) segundo recomendações fabricante.

Cada produto de PCR foi purificado usando Kit de purificação QIAquick (Qiagen) e o produto de PCR específico foi obtido após a digestão com a respectiva enzima de restrição. Após isso, o fragmento foi precipitado com etanol a 100% e 3M acetato de sódio e foi ligado no correspondente vector pTrcHis utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen, Life

Technologies, EUA) e introduzido em células de *Escherichia coli* DH5 (Hanahan, 1983). Colônias portando plasmídeo recombinante pTrcHis-TgROP2 foram identificadas por PCR usando sequencias iniciadoras para o vetor pTrcHis. O fragmento de DNA clonado no plasmídeo foi sequenciado pelo método dideoxi, também utilizando iniciadores específicos para o vetor pTrcHis e confirmada a manutenção da estrutura usando o software Sequencher.

4.4.4.2 Condições de cultura

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

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

4.4.4.3 Purificação de rTgROP2

A fração solúvel foi aplicada em coluna de resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen) pré-equilibrada (20 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl; pH 7,8) por 30 minutos a 25°C. A *E. coli* e as proteínas não ligadas foram removidas da coluna por escoamento em gravidade e as resinas NiNTA foram lavadas (20 mM NaH₂PO₄; 500 mM NaCl; pH 6,8). O antígeno solúvel recombinante, ligado a resina pela cauda de 6 histidinas, foi eluído da resina por fluxo de gravidade com tampão nativo de eluição (200 mM NaH₂PO₄; 5 M de NaCl; pH 4,0).

O antígeno TgROP2 recombinante purificado foi submetido a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e coloração de Comassie coloidal seguindo procedimento padrão, mostrando proteína com 54kDa. As concentrações da proteína foram determinadas pelo BCA Protein Assay Reagent (Pierce Chemical Co.).

4.4.5 Preparo da Vacina ISCOMATRIX + rROP2

Para o preparo do ISCOMATRIX foram adicionados 500 mg de Fosfatidilcolina e 250 mg de colesterol, dissolvido em 2,5 mL de clorofórmio, mantido em estufa a 45°C até evaporar. O filme formado foi hidratado com 15 mL tampão tris (140 mM, pH 7,4) contendo 500mg de Quil-A, homogeneizado por 15 horas em temperatura ambiente e liofilizado por 5 horas a -82°C. Após essas etapas, foi reconstituído em 60 mL de água ultra pura por 2 horas, sob agitação e armazenado a -18°C até o uso (KAWASAKI et al., 2007). Para definição da quantidade de adjuvante adicionado a dose da vacina, considerou-se, como parâmetro a quantidade de Quil-A presente na composição do ISCOMATRIX.

As doses da vacina foram compostas pela proteína associada ao ISCOMATRIX na proporção 1:1. Assim a composição de ISCOMATRIX+rROP2 foi 200 µg do Quil-A presente no adjuvante (25 µl de ISCOMATRIX) e 200 µg de proteína recombinante rROP2 do *Toxoplasma gondii* com água ultrapura para um volume final de 1 ml.

Quando o adjuvante foi utilizado nos animais do grupo controle, o mesmo foi preparado com 25 µl de ISCOMATRIX (200 µg do Quil-A) com água ultrapura para um volume final de 1 ml.

4.4.6 Delineamento Experimental

Doze suínos cruzados (Landrace x Large White) entre 25 e 30 dias de idade, incluindo fêmeas e machos castrados foram utilizados no experimento. Os suínos foram pesados e alocados dois a dois, por sorteio, em baias separadas de concreto onde aguardaram por um período de seis dias de adaptação antes do início do experimento. Todos os animais receberam ração isenta de quimioterápicos e água *ad libitum* e apresentaram sorologia negativa (IgG anti-*T.gondii* - título < 16) na imunofluorescência indireta (RIFI) (CAMARGO, 1973).

Os suínos foram divididos em três grupos, G1 (n=4), receberam 200 µg de proteínas recombinantes rROP2 associadas ao imunoestimulante ISCOMATRIX, G2 (n=4) receberam ISCOMATRIX e G3 (n=4) receberam PBS.

As imunizações foram realizadas em seis doses pela via nasal (dias 0, 14, 28, 42, 56 e 72) e, posteriormente, mais três doses pela via intramuscular (dias 86, 93 e 100) em preparações contendo 1 ml. As doses pela via nasal foram administradas utilizando

seringa de 1ml acoplada a uma sonda de 10 cm de comprimento. As imunizações foram realizadas introduzindo alternadamente, para cada dose, 10 cm da sonda na cavidade nasal dos animais. Posteriormente, ainda com a sonda posicionada, adicionou-se aproximadamente 1 ml de PBS de modo que todo conteúdo presente na sonda tenha sido disponibilizado aos animais. As imunizações realizadas pela via intramuscular foram administradas alternadamente na região do pescoço.

No dia 110 todos os animais foram desafiados com $\sim 4 \times 10^4$ oocistos infectantes da cepa VEG pela via oral em uma preparação contendo de 3 a 5 ml. Três dias após o desafio foi coletado sangue total de todos os animais para avaliação da parasitemia.

Amostras de soro foram obtidas semanalmente por venopunção da veia cava caudal utilizando-se agulhas descartáveis de 40x12mm, obtendo um total de 23 coletas distribuídas nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 36, 42, 50, 56, 69, 72, 79, 86, 93, 97, 100, 102, 111, 113, 119, 126, 132 e 145. Os soros foram armazenados a -20°C até a realização da prova de ELISA.

Os animais foram examinados diariamente quanto a alterações clínicas. A temperatura foi analisada semanalmente até o dia do desafio, diariamente por dez dias após o desafio e quinzenalmente até o dia do abate. Os sinais clínicos durante a parasitemia foram controlados com sulfadiazina e trimetoprim (GARCIA et al, 2005).

No dia 145 (35 dias após o desafio) foi procedido o abate dos animais do G1, G2 e G3 e coletados tecidos para realização da prova de bioensaio em camundongos.

4.4.7 Avaliação da Imunidade Humoral

A presença de anticorpos anti-rROP2 do *T. gondii* no soro dos suínos, durante todo o experimento, foi avaliada pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG, IgM e IgA segundo metodologia descrita por Garcia et al. (2005). Placas de ELISA (microplacas Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Denmark) contendo 96 poços foram adsorvidas com $5 \mu\text{g/ml}$ de proteínas recombinantes (ROP2) (IGARASHI et al., 2008) em 0,1M de tampão carbonato-bicarbonato Ph 9,6 na concentração de $5 \mu\text{g/ml}$ de proteínas, e distribuída $100 \mu\text{l}$ em cada cavidade das microplacas e posteriormente incubadas a 4°C por 12 horas.

As placas foram bloqueadas com $200 \mu\text{l}$ de tampão de bloqueio (tampão carbonato-bicarbonato 8% de leite em pó desnatado) por 1 h. Foram adicionadas em

duplicata, 100 µl de alíquotas de soros diluídas (1:200), incluindo os controles positivos e negativos, em tampão PBS-tween 20 adicionado de 5% de leite em pó desnatado e incubadas a 1 h a 37 °C. Conjugado anti-IgG (1:5000) , anti-IgM (1:2500) e anti-IgA (1:5000) suíno marcados com peroxidase foram utilizados para detectar a presença de anticorpos. Posteriormente, as microplacas foram lavadas três vezes com tampão PBS-tween 20 (10Mm TRIS-HCl e 150 Mm NaCl, Ph 7,5) em equipamento lavador de placas (Bio-Rad ImmunoWash – Model 1575). A reação foi revelada pela solução de substrato cromógeno(40 µl de H₂O₂ (30%); 40 mg de OPD (*Ophenylenediamine dihydrochloride*-Sigma; 100 ml de 0.1M tampão fosfato / citrato, pH 6,0 e 40 µl of H₂O₂) e interrompida com 50 µl de solução 0,1M de ácido clorídrico. A densidade Óptica (DO) a 490nm foi avaliada em um leitor de placas iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad).

Os títulos de anticorpos foram determinados segundo Garcia et al., (2006a) e Cunha et al., (2012). Primeiramente foram obtidos índices da amostra segundo a fórmula: índice da amostra = [(DO_{média amostra}) - (DO_{média controle negativo}) / (DO_{média controle positivo}) - (DO_{média controle negativo})] e foram mantidos os mesmos controles positivos e negativos, para correção das variações dos valores encontrados entre as placas. As densidades óticas corrigidas (DO_{corr}) foram obtidas através de cálculo de regressão linear simples utilizando como parâmetros as médias das DO dos controles positivo (n=15) e negativo (n=15) e os índices das amostras de cada placa. As amostras foram consideradas positivas quando DO_{corr} > [(DO controle negativo; n=15) + 3 desvios padrão (controle negativo; n=15)].

4.4.8 Pesquisa do *T. gondii* dos Tecidos

4.4.8.1 Avaliação da parasitemia

A parasitemia seguiu metodologia descrita por Costa et al. (1977), com modificações. O sangue total 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 RIFI.

4.4.8.2 Bioensaio em camundongos

A presença de cistos nos tecidos dos suínos foi verificada pelo bioensaio em camundongos (DUBEY, 1998).

Cinquenta gramas de amostras de tecidos por animal (coração, masseter, diafragma e língua - 12,5 g cada) foram submetidas a digestão em solução de pepsina (0,14 M NaCl; DIFCO™ Pepsin 1:10.000; 168 mM HCl) por uma hora a 37°C, neutralizadas com bicarbonato de sódio a 1,2% (pH 8,3), filtradas em quatro camadas de gaze estéril e centrifugadas (1180xg; 10 min). O sedimento foi ressuspensão em 35 ml de PBS (pH 7,2) e centrifugado (1180xg; 10 min). O conteúdo digerido final foi ressuspensão em 5 ml de solução fisiológica estéril e inoculado com antibiótico (1,000 U penicilina e 100 µl de estreptomicina /ml) em três camundongos (1 ml/camundongo) pela via subcutânea.

Os camundongos inoculados foram observados diariamente para verificação de sinais clínicos (pêlos eriçados, lacrimejamento, emagrecimento, diarreia, distensão abdominal). Os soros e cérebros dos camundongos sobreviventes 45 dias após a inoculação foram coletados. A presença de anticorpos IgG anti *T. gondii* foi avaliada pela RIFI considerando como positivos títulos ≥ 16 (CAMARGO, 1973). Os cérebros foram coletados e avaliada a presença de cistos encontrados em quatro amostras (IGARASHI et. al., 2008).

4.4.9 Análise Estatística

As diferenças estatísticas entre as respostas imunes foram avaliadas pelos testes de ANOVA e quando foi o caso pelo teste de Kruskal-Wallis. O teste t de Student foi utilizado para identificar diferenças entre as médias. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para verificar diferenças estatísticas nos resultados do bioensaio. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

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

Os resultados apresentados como média estão acrescidos de suas medidas de incerteza como desvio padrão (DESVPAD) ou erro padrão (EPAD).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos observados foram aumento de temperatura ($>40,0^{\circ}\text{C}$, Fig. 1) do terceiro ao sétimo dia pós desafio (DPD), com picos de temperaturas médias observadas no quarto DPD ($41,1\pm 0,569$) e no quinto DPD ($41,0\pm 0,569$) e anorexia e prostração ao quinto DPD em todos os animais do G1, G2 e G3 e no quinto DPD os animais foram tratados com sulfadiazina (3 mg/kg) e trimetoprim (15 mg/kg) pela via IM em dose única (GARCIA et al, 2005).

4.5.2 Resposta Imune Humoral

As avaliações dos anticorpos IgG, IgM e IgA anti rRPO2 do *T.gondii* estão demonstradas na Figura 2. As densidades óticas (DO) foram calculadas segundo metodologia já descrita e os pontos de corte (PC) calculados foram: $\text{IgG}_{\text{PC}}=0,177$; $\text{IgM}_{\text{PC}}=0,237$; $\text{IgA}_{\text{PC}}=0,305$.

Após as seis doses da vacina pela via intranasal no G1, foram encontrados anticorpos da classe IgG apenas em um animal no dia 77 e em dois animais no dia 86. Anticorpos da classe IgM e IgA não foram detectados após administração da vacina pela via intranasal. Nos G2 e G3 não foram detectados anticorpos IgG, IgM e IgA após as administrações de ISCOMATRIX e PBS, respectivamente.

Após três doses da vacina pela via intramuscular, no G1 foram encontrados anticorpos da classe IgG em um animal no dia 97 e em todos os animais no dia 103 ($p<0,05$). Anticorpos da classe IgM foram detectados em dois animais no dia 93 em todos os animais no dia 100 e anticorpos da classe IgA foram detectados em dois animais no dia 93, em três animais no dia 97 ($p<0,05$) e em todos os animais no dia 100 ($p<0,05$). No dia 103 todos os animais do G1 apresentaram anticorpos IgG ($p<0,05$), IgM e IgA ($p<0,05$) com títulos acima do ponto de corte.

No dia do desafio (110) todos os animais do G1 apresentaram anticorpos com títulos médios (DO_m) acima do ponto de corte: IgG ($\text{DO}_m 0,893\pm 0,132$; $p<0,001$), IgM ($\text{DO}_m 0,778\pm 0,544$; $p<0,05$) e IgA ($\text{DO}_m 0,895\pm 0,368$; $p<0,05$). Animais do G2 e G3 permaneceram com anticorpos IgG, IgM e IgA com valores abaixo do ponto de corte antes do desafio.

Após o desafio, altos níveis de anticorpos foram detectados nas avaliações de IgG e IgA. O pico de anticorpos dos animais do G1 foram encontrados no dia 126 para IgG (DO_m 1,250±0,158; $p<0,001$), dia 113 para IgM (DO_m 0,776±0,708; $p<0,05$) e no dia 126 para IgA (DO_m 1,436±1,154). Após esses dias foi observada queda gradativa dos níveis de anticorpos até o dia do abate.

A infecção pelo *T. gondii* nos suínos não imunizados (G3) foi detectada pelo ELISA no dia 119, nove dias após a infecção, através da confirmação de anticorpos da classe IgG em três animais e das classes IgM e IgA em dois animais. O teste ELISA também detectou anticorpos IgA no soro de um animal no dia 103, três dias após a infecção.

No dia 126 todos os animais do G1, G2 e G3 soro converteram com títulos acima do ponto de corte para IgG, IgM e IgA. A soro conversão foi confirmada pela RIFI (títulos IgG ≥ 16).

4.5.3 Pesquisa de *T. gondii* nos tecidos

Os resultados das avaliações da parasitemia e do bioensaio estão descritos na tabela 3. Os animais do G1, G2, e G3 apresentaram 6/24 (25,0%), 9/23 (39,1%) e 10/24 (41,7%), respectivamente, camundongos positivos ao bioensaio. Os valores de FP calculados foram 40,0% e 6,1% nos G1 e G2, respectivamente, comparados com o G3.

4.6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram observados soro conversão após as doses de vacinas pela via intramuscular em todos os animais vacinados (G1) antes do desafio e altos níveis de anticorpos observados nos animais após a infecção. Outros estudos envolvendo imunizações em suínos também encontraram resultados similares. Kringel et al., (2004) vacinaram suínos com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* com oligodeoxynucleotídeos (ODN) sintéticos específicos de suínos e imunoestimulador (CpG) e após as imunizações os títulos de IgG anti-*T.gondii*, analisados pela teste de aglutinação modificada (MAT), foram até 10 vezes maiores nos grupos vacinados comparado ao grupo controle antes do desafio. Freire et al. (2003) imunizaram suínos com uma vacina utilizando-se de antígenos de superfície do *T. gondii* incorporados ao Complexo Imuno Estimulante (ISCOM) e após o desafio verificaram que a vacina foi capaz de estimular uma forte resposta imune humoral. Garcia et al. (2005) e Cunha et al (2012) e imunizaram suínos com proteínas de roptrias

nativas do *T. gondii* e encontraram estimulação parcial da resposta imune antes do desafio. Jongert et al. (2008) Após as imunizações os autores verificaram produção de altos títulos de IgG e resposta imune celular em suínos imunizados com vacina de DNA expressando as proteínas GRA1 e GRA7 e após desafio com cistos de *T. gondii* pela via intraperitoneal.

Garcia et al. (2006a) padronizaram uma técnica de ELISA para avaliar os anticorpos IgG anti-roptrias do *T. gondii* em soros de suínos e observaram a soro conversão no 14º dia após a infecção com pico de anticorpos no dia 42. Lind et al. (1997) observaram anticorpos anti IgG com início do 10º ao 14º dia após a infecção. No presente estudo, utilizando o teste de rROP2-ELISA, nove dias após a infecção (dia 119) foi detectado presença de anticorpos da classe IgG em três animais (DO=0,181; DO=0,181; DO=0,195), da classe IgM (DO=0,241; DO=0,348) e da classe IgA (DO=0,370; DO=0,389) ambos em dois animais. Dubey et al. (1994) verificaram a imunidade protetora iniciada sete dias após a inoculação de taquizítos da cepa RH, permanecendo durante sete meses.

A prova de bioensaio em camundongos tem sido utilizada como teste ouro para indicar o nível de infecção em suínos em estudos de imunoestimulantes e vacinas contra *T. gondii* (DUBEY; URBAN; DAVIS (1991); DUBEY et al., 1998b; PINCKNEY et al. 1994; KRINGEL et al. 2004; GARCIA et al. 2005; JONGERT et al., 2008; BUGNI et al. 2008; CUNHA et al., 2012). No presente estudo o bioensaio em camundongos foi utilizado para avaliar a presença do *T. gondii* após desafio, em sangue e tecidos dos animais vacinados, comparados aos não vacinados e os animais do G1, G2, e G3 apresentaram 6/24 (25,0%), 9/23 (39,1%) e 10/24 (41,7%) camundongos positivos ao bioensaio, respectivamente. Em dois estudos que avaliaram a imunização de suínos com proteínas nativas de roptrias do *T. gondii* os autores relataram valores de fração de prevenção (FP) de 20% (GARCIA et al., 2005) e 41,0% (CUNHA et al., 2012) contra a formação de cistos teciduais nos animais vacinados com pelas vias subcutânea e nasal, respectivamente, e Garcia et al. (2005) diagnosticaram 65,6% e 54% dos camundongos positivos para *T. gondii*, na prova de bioensaio com músculos, no grupos controle e vacinado, respectivamente, enquanto que no presente estudo, verificou-se a positividade de 66,7% no grupo controle e 50% no grupo vacinados. Dubey; Urban; Davis (1991) verificaram que a porcentagem de camundongos positivos para *T. gondii*, inoculados com tecidos dos animais vacinados taquizoítos da cepa RH era menor (31,6%) que dos não vacinados (60%).

No presente estudo, não foram detectados, pelo bioensaio em camundongos, cistos teciduais em um suíno do grupo vacinado. Utilizando o bioensaio em camundongos, Cunha et al. (2014) também não detectaram a presença de cistos teciduais no cérebro de um

suíno (25%) de um total de quatro animais vacinados. Kringel et al. (2004) não detectaram a presença de cistos em coração de suínos infectados com oocistos do *T. gondii* e 54% dos animais imunizados com taquizoítas e imunestimulador CpG não desenvolveram cistos teciduais. Dubey et al. (1994) após imunização com taquizoítas da cepa RH e Freire et al. (2003) utilizando como vacina antígenos de superfície do *T. gondii* incorporado ao ISCOMs não isolaram, após desafio, cistos teciduais do *Toxoplasma gondii* nos animais vacinados.

A presença de taquizoítas no sangue dos suínos foi detectada três dias após a infecção em todos os animais do G2 e em um suíno do G3, na presente pesquisa. Bugni et al. (2008) detectaram, pelo bioensaio, a presença de taquizoítas também em três dias pós infecção no grupo controle e em 14 DPD no grupo vacinado.

Sinais clínicos apresentados em suínos, após a infecção por *T. gondii*, dependem da raça e idade dos animais, fase do parasita e características das cepas (DUBEY, 2010), vias de administração, estado nutricional e o número de parasitas inoculados (BEKNER DA SILVA et al., 1994; DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1994; JUNGENSEN et al., 1999). Proteção contra sinais clínicos foi observada quando parasitas vivos ou antígenos nativos totais foram utilizados como imunógenos. Freire et al. (2003) e Kringel et al. (2004) não encontraram sinais clínicos nos animais vacinados com antígenos de superfície e taquizoítas vivos, respectivamente, e desafiados com oocistos do *T. gondii*, mas mesmo imunizando suínos com proteínas nativas de roptrias Garcia et al., (2005) e Cunha et al. (2012) não encontraram proteção contra os sinais clínicos nos animais vacinados.

Os sinais clínicos observados nesse estudo foram aumento de temperatura do terceiro ao sétimo DPD e anorexia e prostração do quinto ao sexto DPD em todos os animais do experimento e no quinto dia realizou-se o tratamento dos sinais clínicos. Utilizando também como desafio, 4×10^4 oocistos da cepa VEG, Garcia et al., (2005) encontraram sinais clínicos similares, nos animais controles e vacinados, como secreção ocular, tosse, anorexia, prostração e hipertermia do quarto ao sétimo e no quinto dia DPD, também fez o tratamento dos sinais clínicos. Mesmo desafiando suínos com 10^3 oocistos da cepa VEG do *T. gondii*, Cunha et al. (2012) não observaram proteção contra manifestação clínica, relatando hipertermia do sexto ao oitavo DPD nos animais vacinados com roptrias do *T. gondii* incorporadas ao imunoestimulante Quil-A. Bugni et al. (2008) relataram sinais clínicos, caracterizados por tosse e secreção ocular, acompanhados de hipertermia entre o terceiro e o quinto dia pós-infecção.

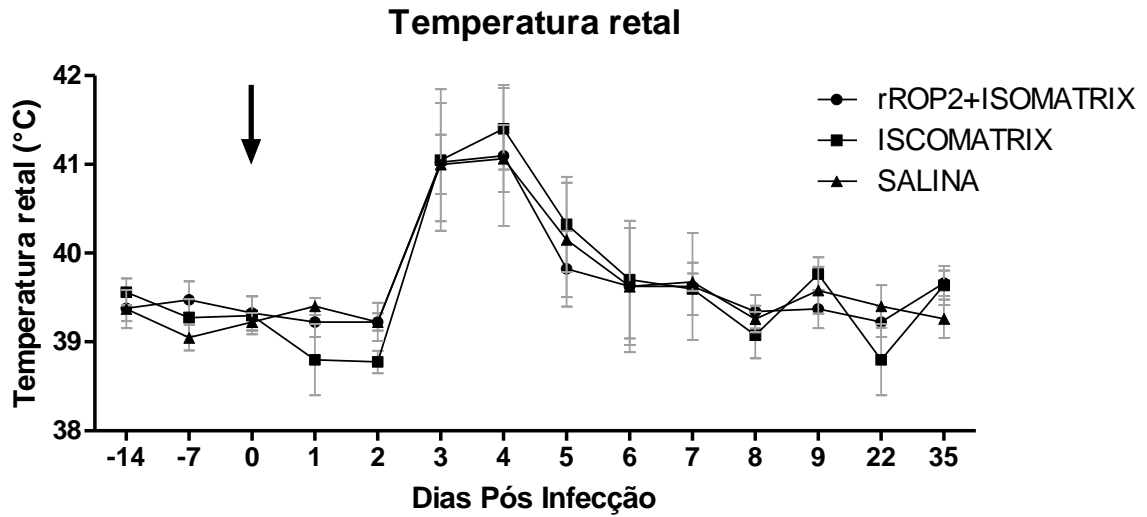
4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi observado que as proteínas recombinantes do *T. gondii* administradas pela via nasal com ISCOMATRIX não estimularam a resposta imune. No entanto, as proteínas recombinantes do *T. gondii* administradas pela via intramuscular associadas ao ISCOMATRIX estimularam a produção de altos títulos de anticorpos em suínos antes do desafio. Proteção parcial contra a presença do *Toxoplasma gondii* nos tecidos quando comparados aos grupos controles também foi encontrada.

Mesmo obtendo sucesso na imunização pela via intramuscular, o fato de ter utilizado uma única proteína recombinante (ROP2) do *Toxoplasma gondii* como imunógeno pode ter relação com a proteção parcial encontrada contra a presença do *Toxoplasma gondii* nos tecidos. Assim, estudos sobre imunizações contra *T. gondii* envolvendo duas ou mais proteínas recombinantes associadas na mesma vacina devem ser avaliadas no futuro, para um melhor estímulo da resposta imune em suínos.

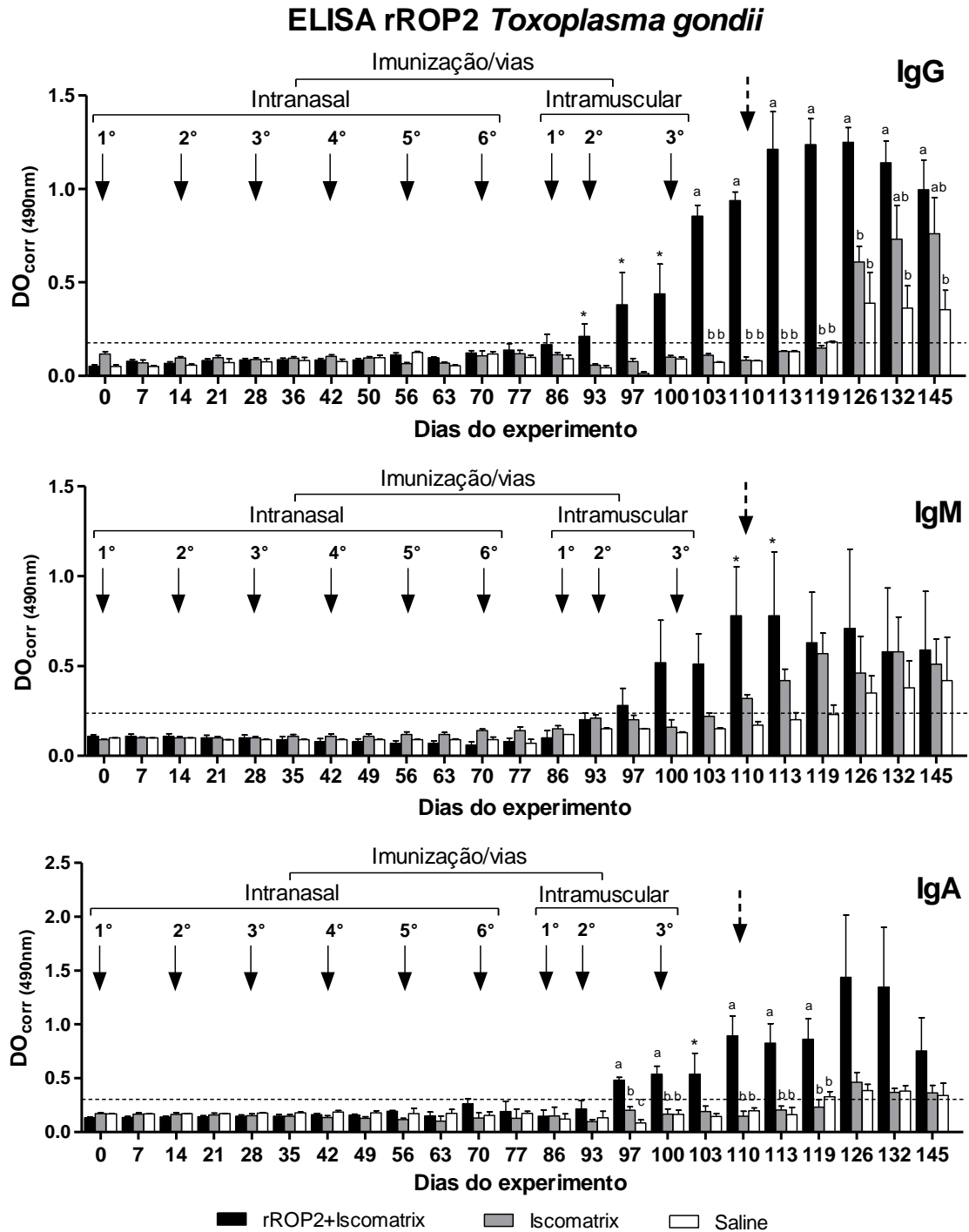
Devido aos problemas relacionados com a toxoplasmose ocular pós natal em seres humanos e considerando os suínos como modelos biológicos, estudos sobre imunizações objetivando a redução de lesões oculares causadas pelo *Toxoplasma gondii* em suínos devem ser estimulados.

Figura 1. Temperatura retal (média±DESVPAD) de suínos do G1, G2 e G3. No dia zero (dia 110 do experimento) todos os animais foram desafiados com 4×10^4 oocistos esporulados da cepa VEG. No dia 35 (dia 145 do experimento) os animais foram abatidos.



Fonte: o próprio autor.

Figura 2. Imunidade humoral anti-rROP2 do *Toxoplasma gondii* em suínos (média±EPAD) analisadas pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA).



Flecha tracejada: desafio com $\sim 4 \times 10^4$ oocistos infectantes VEG; (a, b, c; $p < 0,05$; t Student); (* $p < 0,05$; Kruskal-Wallis).

Fonte: o próprio autor.

Tabela 1. Resultado da avaliação da presença *Toxoplasma gondii*, pelo bioensaio em camundongos, em sangue e tecidos de suínos após desafio com oocistos esporulados da cepa VEG do *Toxoplasma gondii*.

Grupos/ Animais	Imunização	Bioensaio			FP. ²
		Sangue 3 DPI ¹	Músculos 35 DPD	Positivos/total	
G1					
1	rROP2 (200µg) + Iscomtarix	0/3 ^a	2/3	6/24 (25,0%)	40,0
2		0/3	3/3		
3		0/3	0/3		
4		0/3	1/3		
G2					
5	Iscomatrix	2/2	3/3	9/23 (39,1%)	6,1
6		1/3	0/3		
7		1/3	1/3		
8		1/3	0/3		
G3					
9	PBS	0/3	1/3	10/24 (43,5%)	NA ³
10		0/3	1/3		
11		0/3	3/3		
12		2/3	3/3		

¹Dias pós infecção; ²Fração de prevenção (FP) calculada para os grupos; ³Não avaliada; ^anúmero de camundongos positivos para *T. gondii* com título de anticorpos ≥ 16 (RIFI) ou com presença de cistos teciduais nos cérebros, entre os três inoculados.

Fonte: o próprio autor.

4.8 REFERÊNCIAS

- ARANTES, T. P.; LOPES, W. D. Z.; FERREIRA, R. M. et al. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 2, p. 190-194, 2009.
- BEKNER DA SILVA, A. C.; MITSUKA, R.; NAVARRO, I. T. et al. 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.
- BUGNI, F. M.; CUNHA, I. A. L.; ARAÚJO, M. A. et al. Ação da β -glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, Supl. 1, p. 249-259, 2008.
- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-171, 1973.
- COSTA, A. J.; ARAUJO, F. G.; COSTA, J. O. et al. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 63, p. 212-218, 1977.
- CUNHA, I. A. L.; ZULPO, D. L.; BOGADO, A. L. G. et al. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 216 – 221, 2012.
- DRANE, D.; PEARSE, M. The ISCOMATRIX adjuvant. In: SCHIJNS VE, O'HAGAN DT (eds). **Immunopotentiators in Modern Vaccines**. Elsevier Academic Press: Amsterdam; Boston, 2006, pp 191–216
- DUBEY, J. P.; MURRELL, K. D.; FAYER, R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 1941-1943, 1984.
- DUBEY, J.P., URBAN, J.F., DAVIS, S.W. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1316-1319, 1991.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593–1598, 1994.
- DUBEY, J. P., BAKER, D.G., DAVIS, S.W. et al. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 982-987, 1994.
- DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 65-70, 1996.
- DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K.; SHEN, S. K. et al. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. **Journal of Parasitology**, v. 82, n3, p. 438-43, 1996.
- DUBEY, J. P. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 755-757, 1997.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75-77, 1998.

DUBEY, J.P., LUNNEY, J.K., SHEN, S.K. et al. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 749-752, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89–103, 2009.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2 ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc. 338 p, 2010.

DZIADEK, B.; GATKOWSKA, J.; BRZOSTEK, A. et al. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**. v. 123, n. 1, p.81–89, 2009.

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

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

EL HAJJ, H.; DEMEY, E.; PONCET, J. et al. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. **Proteomics**. v. 6, n. 21, p. 5773–5784, 2006.

FEHLHABER, K., HINTERSDORF, P., KRUGER, G. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs of different management systems and in minced meat. **Fleischwirtschaft**, v. 83, p. 97–99, 2002

FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. et al. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (ISCOMS). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 55, p. 388-396, 2003.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L. et al. Soroprevalência epidemiologia e avaliação ocular do toxoplasmose humana na área rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Pan American Journal of Public Health**, v. 6, p. 157-163, 1999.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T. et al. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into ISCOM. **Experimental Parasitology** 108, 40-46, 2004.

GARCIA J. L, GENNARI SM, NAVARRO IT. et al. 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.; GENARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; NAVARRO, I. *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.; VIDOTTO, O. et al. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 100–105, 2006a.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; BIAZZONO, L. et al. Protective activity against shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 197-206, 2007.

GASPARINI, M. R.; VIEIRA, R. F. C.; NASCIMENTO, D. A. G. Immune response of calves inoculated with proteins of *Anaplasma marginale* bound to an immunostimulant complex. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, 2013.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal Molecular Biology**, v. 166, p. 557-580, 1983.

HU, K-F; LÖVGREN-BENGTSSON, K.; MOREIN, B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. **Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 51, P. 149–159, 2001.

IGARASHI, M.; KANO, F.; TAMEKUNI, K. et al. *Toxoplasma gondii* evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cysts formation in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 386-392, 2008.

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

JONGERT, V.; MELKEBEEK, S.; DE CRAEYE, J. et al. An enhanced GRA1—GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. **Vaccine**, v. 26, p. 1025-1031, 2008.

JUNGERSEN, G.; JENSEN, L.; RIBER, U. et al. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1307-1319, 1999.

KAWASAKI, P.M.; KANO, F.S.; TAMEKUMI, K. et al. Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 347–354, 2007.

KIJLSTRA, A.; EISSEN, O.A.; CORNELISSEN, J. et al. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 3165–3169, 2004.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.G.; MUL, M.F. et al. Animal-friendly production systems may cause re-emergence of *Toxoplasma gondii*. **Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 52, p. 119–132, 2004a.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J. et al. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183–190, 2008.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; BOS, A. P. Food safety in free-range and organic livestock systems: risk management and responsibility. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 12, p. 2629-2637, 2009.

KRINGEL, H.; DUBEY, J. P.; BESHAN, E. CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 55–66, 2004.

LIND, P.; HAUGEGAARD, J.; WINGSTRAND, A. et al. The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 1-15, 1997.

LUNDÉN, A. Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into ISCOMS. **Veterinary Parasitology**, v.56, p. 23-35, 1995.

MARTIN, V.; SUPANITSKY, A.; ECHEVERRIA, P. C. et al. Recombinant GRA4 or ROP2 Protein Combined with Alum or the *gra4* Gene Provides Partial Protection in Chronic Murine Models of Toxoplasmosis **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 704-710, 2004.

MEERBURG, B.G.; BONDE, M.; BROM, F.W.A. et al. Towards sustainable management of rodents in organic animal husbandry. **Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 52, 195–205, 2004.

MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HOGLUND, S.; DALSGAARD, K.; OSTERHAUS, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. **Nature**, v.308, p.457-460, 1984.

PEARSE, M. J; DRANE, D. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. **Advanced drug delivery review**, v. 57, n. 3, p. 465-474, 2005.

PINCKNEY, R.D.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. et al. Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 438-448, 1994.

ROPPA, L. **Evolução do Mercado Mundial de Suínos nos últimos 30 Anos**. In: ABCS. Produção de Suínos: teoria e prática. 1ªEd. Brasília: ABCS, 2014. 908p.

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

SANCHEZ, V. R.; PITKOWSKI, M. N.; CUPPARI, A. V. C. et al. Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 448–453, 2011.

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

SOLANO-AGUILAR, G. I., BESHAN, E., VENGROSKI, K. G., ZARLENGA, D., JAUREGUI, L., COSIO, M., DOUGLASS, L. W., DUBEY, J.P., LUNNEY, J. K., 2001. Cytokine and lymphocyte profiles in miniature swine after oral infection with *Toxoplasma gondii* oocysts. **International Journal of Parasitology**, v. 31, 187–195, 2001.

SPEER, C. A.; TILLEY, M; TEMPLE, M. E. et al. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. **Molecular & Biochemical Parasitology** 75, 75-86, 1995.

SUN, H-X.; XIE, Y.; YE, Y-P. ISCOMs and ISCOMATRIX™. **Vaccine**, v. 27, n. 33, p. 4388-4401, 2009.

VAN DER GIESSEN, J., FONVILLE, M., BOUWKNEGT, M. et al. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 371–374, 2007.

VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; HUYGEN, K. et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 38–45, 2000.

VERHELST, D.; CRAEYEB, S. DE.; DORNYC, P. IFN- γ expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues are associated with an antibody response against GRA7 in experimentally infected pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 14-21, 2011.

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

CONCLUSÃO

As proteínas de roptrias do *T. gondii* administradas pela via nasal com Quil-A estimularam a resposta imune celular intestinal e sistêmica e parcialmente a produção de anticorpos em suínos.

A proteína recombinante ROP2 do *T. gondii* administradas pela via nasal com ISCOMATRIX não estimularam a produção de anticorpos em suínos.

A proteína recombinante ROP2 do *T. gondii* administradas pela via intramuscular com ISCOMATRIX estimularam a produção de altos títulos de anticorpos em suínos.

Tanto as imunizações com proteínas de roptrias quanto com a proteína recombinante ROP 2 do *T. gondii* não conferiram proteção contra sinais clínicos após desafio com oocistos esporulados nos animais imunizados.

Os suínos do grupo vacinado pela via nasal com proteínas nativas de roptrias do *T. gondii* tiveram uma proteção parcial contra a formação de cistos cerebrais e os suínos do grupo vacinado com rROP2 tiveram uma proteção parcial contra a presença do *Toxoplasma gondii* nos tecidos quando comparados aos grupos controles.

O presente estudo demonstrou que imunizações utilizando proteínas de subunidades ou recombinante do *Toxoplasma gondii* associada a um imunostimulante, pode estimular a resposta imune e conferir proteção contra a presença do parasita nos tecidos com resultados similares aos estudos envolvendo imunizações com o parasita vivo ou proteínas nativas estruturais.

Esses resultados são incentivadores para realização de novos estudos sobre vacinas contra *T. gondii* e indicam a necessidade de estudos envolvendo duas ou mais proteínas recombinantes associadas na mesma vacina, para um melhor estímulo da resposta imune em suínos.

Devido aos problemas relacionados com a toxoplasmose ocular pós natal em seres humanos e considerando os suínos como modelos biológicos, estudos sobre imunizações objetivando a redução de lesões oculares causadas pelo *Toxoplasma gondii* em suínos também devem ser estimulados.