



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

***Toxoplasma gondii* VS RADIAÇÃO IONIZANTE: IMUNIDADE
HUMORAL E CELULAR EM BAÇO E INTESTINO DE
CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS IMUNIZADOS COM
TAQUIZOÍTOS IRRADIADOS POR COBALTO 60**

ANDRÉS JIMENEZ GALISTEO JR.

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

São Paulo
2008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

***Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Imunidade
humoral e celular em baço e intestino de camundongos
isogênicos imunizados com taquizoítos irradiados por
Cobalto 60**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.



**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

São Paulo

2008

Dedico em especial....



*Aos meus pais, **Andrés e Ivani**, meus exemplos
de dignidade, força e determinação.*

*Obrigado pelo amor, carinho, dedicação, apoio
e principalmente, por confiar em mim.*

*A minha amada noiva, **Janaína**, minha
companheira e amiga. Obrigado pela
paciência, apoio e por me ajudar a
realizar meus sonhos.*

Ao meu irmão **Rodrigo** pela torcida e
apoio durante toda esta trajetória

À minha avó **Helena**, pelo amor e
carinho

É para vocês que dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.**, a quem sou muitíssimo grato pela amizade, orientação e pelos conhecimentos transmitidos durante a iniciação científica, mestrado e doutorado, contribuindo para meu crescimento científico e cultural.

À **Dr^a. Nanci do Nascimento**, pelo suporte e pelos momentos descontraídos das festas de fim de ano do CB,

Ao amigo **Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto**, pelos ensinamentos iniciais e por me permitir trabalhar conjuntamente nesse projeto. E também pelas sugestões dadas na qualificação.

Ao amigo **Dr. Patrick Jack Spencer**, pelas sugestões dadas na qualificação e pelos momentos descontraídos propiciados no IPEN.

A **Dr^a Lígia Ely Morganti Ferreira Dias e Dr^a Solange Carbonare** pelas sugestões apresentadas durante o seminário de área.

A **Janaína Baptista Alves**, pela colaboração nos ensaios de subclasses, pela revisão do texto e pela paciência e companheirismo durante este trabalho.

Ao amigo **Dr. Daniel Perez Vieira**, pela amizade, companhia nesses anos de pós-graduação e pelas ajudas indispensáveis na confecção de *primers* e na padronização das reações de real-time PCR.

Ao amigo **Felipe Pessoa de Melo Hermida**, “o ligeirinho”, pela amizade e pelo convívio agradável.

A amiga **Nahiara Esteves Zorgi**, “a pequena 0,5”, pela dedicação e importante contribuição durante o desenvolvimento deste estudo.

Ao amigo **Leonardo da Silva Augusto**, pela importante colaboração nos ensaios finais da tese.

À **Cleusa Fumica Hirata Takakura**, pelo excelente trabalho de microscopia eletrônica, realizado no Departamento de Patologia da FMUSP.

À **Roselaine Pereira Alvim Cardoso**, pelos ensinamentos, amizade, apoio e carinho, durante estes longos anos de convivência.

Aos meus colegas do Laboratório de Protozoologia: **Luciana Regina Meireles**, **Miriam Macre**, **Samanta Etel Borborema**, **Bárbara Fialho Carvalho**, **Sônia Mioranza**, **Ivani José da Silva**, **Bruna Macedo**, **Juliana Nunes Mecca** e **Camila Aparecida de Carvalho**, pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

À Dona **Francisca Lucio de Oliveira**, pelo carinho, torcida e por sempre oferecer as melhores condições de trabalho no laboratório.

Ao grande amigo **Luciano Monteiro da Silva**, pela amizade, auxílio e por nunca medir esforços na ajuda aos alunos.

À **Solange Fernandes Ferreira dos Santos**, pela amizade, conversas e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao **Dr. André Gustavo Tempone Cardoso**, pela convivência, brincadeiras e pelos conselhos.

À **Drª. Eufrozina S. Umezawa**, pelos empréstimos de alguns aparelhos utilizados neste projeto.

Ao **Eng. Carlos G. da Silveira** e **Engª. Elizabeth S. R. Somessari** por possibilitarem a irradiação das amostras utilizadas nesse projeto.

A todos os amigos que fiz no IPEN, em especial, **Murilo Casares da Silva**, **José Alberto Alves da Silva**, **Lucélia de Almeida Campos**, **Thiago Luiz Almeida**, **Priscila Caproni**, **Miriam Fussae Suzuki**, **Dr. João Ezequiel de Oliveira – “Johnny”**, **José Maria** e **Marcos A. Ribeiro Jr.**, pelos momentos agradáveis e descontraídos.

Ao **Dr. José Eduardo Levi** e **Dr. Claudio Sérgio Pannuti**, do Laboratório de Virologia (IMTSP/USP), pela disponibilidade do equipamento de real-time PCR.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro, ao **LIM49FMUSP** e ao **Centro de Biotecnologia/IPEN** pelo suporte dado ao projeto.

Aos funcionários do **Departamento de Ensino/IPEN**, pelo ótimo auxílio dado aos alunos.

A todos meus familiares que direta ou indiretamente torceram por mim. E em especial ao meu afilhado Vitor Hugo.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste projeto.

À Deus.

À **Drª. Eufrozina S. Umezawa**, pelos empréstimos de alguns aparelhos utilizados neste projeto.

Ao **Eng. Carlos G. da Silveira** e **Engª. Elizabeth S. R. Somessari** por possibilitarem a irradiação das amostras utilizadas nesse projeto.

A todos os amigos que fiz no IPEN, em especial, **Murilo Casares da Silva**, **José Alberto Alves da Silva**, **Lucélia de Almeida Campos**, **Thiago Luiz Almeida**, **Priscila Caproni**, **Miriam Fussae Suzuki**, **Dr. João Ezequiel de Oliveira – “Johnny”**, **José Maria** e **Marcos A. Ribeiro Jr.**, pelos momentos agradáveis e descontraídos.

Ao **Dr. José Eduardo Levi** e **Dr. Claudio Sérgio Pannuti**, do Laboratório de Virologia (IMTSP/USP), pela disponibilidade do equipamento de real-time PCR.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro, ao **LIM49FMUSP** e ao **Centro de Biotecnologia/IPEN** pelo suporte dado ao projeto.

Aos funcionários do **Departamento de Ensino/IPEN**, pelo ótimo auxílio dado aos alunos.

A todos meus familiares que direta ou indiretamente torceram por mim. E em especial ao meu afilhado Vitor Hugo.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste projeto.

À Deus.

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertolt Brecht



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174



São Paulo, 08 de maio de 2008.

Ilmo (a)

Sr (a) Andrés Jimenez Galisteo

Em reunião na presente data, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CE-IMT/005/29042008** e intitulado "Toxoplasma gondii vs radiação ionizante: imunidade humoral, celular e produção de interleucinas intestinais em camundongos protegidos com taquizoítos irradiados.", sob a responsabilidade do Dr. Heitor Franco de Andrade Junior.

Atenciosamente


Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

Coordenadora do CEP-IMT

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS¹

γ	gama
^{60}Co	Cobalto-60
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
<i>g</i>	RCF (<i>relative centrifugal force</i>)
Gy	Gray (dose de radiação)
H_2O_2	Água oxigenada 30%
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
i.p	Inóculo parenteral
$\text{IFN-}\gamma^{-/-}$	Camundongo geneticamente deficiente de IFN- γ
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
° C	graus Celsius
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Inibidor de proteases (phenylmethanesulfonyl fluoride)
Real-time PCR	Reação em cadeia pela polymerase em tempo real (<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>)
Th	Linfócito T helper
v.o	Inóculo oral
v/v	Volume a volume
β -actina	Proteína constitutiva de camundongo
μg	Microgramas
μL	Microlitros

¹ Devido ao uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia em inglês.

SUMÁRIO

	Página
I INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Radiação ionizante.....	01
1.1.1 Conceitos Gerais.....	01
1.1.2 Radiação em parasitoses.....	03
1.2 Toxoplasmose.....	06
1.2.1 Histórico.....	06
1.2.2 Ciclo de vida.....	07
1.2.3 Toxoplasmose em humanos e aspectos epidemiológicos.....	10
1.2.4. Toxoplasmose em animais.....	14
1.3 Imunidade na toxoplasmose.....	15
1.3.1 Sistema imune das mucosas na toxoplasmose.....	18
1.4 Vacinas para toxoplasmose.....	21
II OBJETIVOS.....	24
III MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Parasitas.....	26
3.1.1 Cepa RH (virulenta).....	26
3.1.2 Cepa ME49 (cistogênica).....	27
3.2 Animais experimentais.....	27
3.3 Irradiação dos taquizoítos de <i>T. gondii</i>	28
3.4 Imunização dos animais.....	29
3.5 Obtenção do antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	29
3.6 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal.....	30
3.7 Obtenção das amostras de soro dos animais imunizados.....	31
3.8 Detecção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro dos animais imunizados, por ELISA.....	31
3.9 Determinação das subclasses de IgG em camundongos C57Bl/6j e BALB/c.....	32
3.10 Obtenção da suspensão fecal dos animais imunizados.....	32
3.11 Detecção de anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas suspensões fecais, por ELISA.....	33

3.12 Avaliação da expressão relativa de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos e células intestinais de animais imunizados, por <i>real-time</i> PCR.....	34
3.12.1 Obtenção dos esplenócitos e células intestinais.....	34
3.12.2 Extração e quantificação de RNA.....	35
3.12.3 Síntese de cDNA.....	35
3.12.4 Confeção dos primers e eficiência de detecção.....	35
3.12.5 Condições da reação e análise dos resultados.....	36
3.13 Desafio dos animais imunizados e quantificação do número de cistos.....	37
3.14 Análise estatística.....	38
IV RESULTADOS.....	39
4.1 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados de <i>T. gondii</i>	39
4.2 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com taquizoítos de <i>T. gondii</i> irradiados a 255Gy.....	42
4.3 Determinação das subclasses de imunoglobulina G.....	43
4.4 Avidez no soro após imunização.....	45
4.5 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com parasitas irradiados a 255Gy.....	46
4.6 Quantificações relativas por <i>real-time</i> PCR, das citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10), em esplenócitos e células intestinais, de camundongos imunizados com taquizoítos de <i>T. gondii</i> irradiados.....	47
4.7 Desafio com cistos da cepa ME49 dos animais imunizados com taquizoítos irradiados.....	51
4.8 Imunização e desafio dos animais geneticamente deficientes de IFN- γ ...	52
4.9 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados com parasitas irradiados a 255Gy.....	54
4.10 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados com parasitas irradiados a 255Gy.....	55
4.11 Desafio com cistos da cepa ME-49 dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados com taquizoítos irradiados.....	56

V DISCUSSÃO.....	58
VI CONCLUSÕES.....	74
VII REFERÊNCIAS.....	76
VII ANEXOS.....	100

ANEXOS

Anexo 1 - Produção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 2 - Excreção de anticorpos IgG, IgA e IgM, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 3 - Produção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 4 - Excreção de anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy.

Anexo 5 - Variação da expressão gênica de citocinas esplênicas por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy.

Anexo 6 - Variação da expressão gênica de citocinas intestinais por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy.

Produção científica no período

Anexo 7: Meireles, L.R.; Tsutsui, V.S.; Carmo, C.V.; Galisteo JR, A.J.; Hiramoto, R.M.; Terentowicz, H.C.K. & de Andrade JR, H.F. Quantitative *Toxoplasma gondii* oocyst detection by a modified Kato Katz test using Kinyoun staining (KKK) in ME49 strain experimentally infected cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 50: 187-190, 2008.

Anexo 8: Leal, F.; Cavazzana, C.L.; de Andrade JR, H. F.; Galisteo JR, A.J.; Mendonça, J.S. & Kallas, E.G. *Toxoplasma gondii* Pneumonia in Immunocompetent Subjects: Case Report and Review. **Clinical Infectious Diseases**, 44: e62-e66, 2007.

- Anexo 9:** Meireles, L.R.; Galisteo JR, A.J.; Pompeu, E. & de Andrade JR, H. F. Environmental *Toxoplasma gondii* spreading in urban area evaluated by seroprevalence in free living cats and dogs. TM & IH. **Tropical Medicine and International Health**, 9(8): 876-881, 2004.
- Anexo 10:** Galisteo JR, A.J.; Zorgi, N.E.; Alves, J.B.; Hiramoto, R. M.; Nascimento, N. & de Andrade JR, H. F. Humoral immune response of C57BL/6J and BALB/c mice immunized with irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* RH strain and oral challenge with ME-49 strain. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2007), 2007, Santos.
- Anexo 11:** Alves, J.B.; Vieira, D. P.; Galisteo JR, A.J.; Miyagui, C.Y.; Caproni, P.; Casare, M.S.; Spencer, P.J. & Nascimento, N. Structure alteration and immunological properties of Bothropstoxin-I irradiated with ⁶⁰Co gamma rays. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2007), Santos.
- Anexo 12:** Galisteo JR, A.J.; Hiramoto, R.M.; Carmo, C. V.; Alves, J.B. & de Andrade JR, H.F. 255Gy irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* induce intestinal immune response in C57BL/6J mice immunized by oral route. In: The International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2005), Santos.
- Anexo 13:** 15º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- Anexo 14:** XXXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXIII Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2007.
- Anexo 15:** XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2006.
- Anexo 16:** XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2006.
- Anexo 17:** XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e o I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005.
- Anexo 18:** XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e o I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005.
- Anexo 19:** XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology & XXXII Annual Meeting on basic Research in Chagas Disease, 2005.
- Anexo 20:** XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology & XXXII Annual Meeting on basic Research in Chagas Disease, 2005.
- Anexo 21:** XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

- Anexo 22:** XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.
- Anexo 23:** XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.
- Anexo 24:** XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.
- Anexo 25:** XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.
- Anexo 26:** XXXI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease & XX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2004.

I – INTRODUÇÃO

1.1 Radiação ionizante

1.1.1 Conceitos Gerais

As radiações são ondas eletromagnéticas ou partículas que se propagam com determinada velocidade, contém energia e carga elétrica. Podem ser geradas por fontes naturais ou artificiais criadas pelo homem. As radiações eletromagnéticas podem ser divididas em dois grupos, as não ionizantes (ondas de rádio e televisão, telefonia móvel e microondas) e ionizantes, as quais são subdivididas em corpusculares (α , β , nêutrons, elétrons e prótons) e as eletromagnéticas como os raios X e radiação gama.

A radiação ionizante além de muito empregada na esterilização de alimentos e produtos hospitalares, também apresenta um grande potencial de utilização na produção de vacinas (WALES & KUSEL, 1992), pelo fato de produzir danos diretos ou indiretos sobre as moléculas reprodutoras dos seres vivos. Esse tipo de radiação apresenta alta energia e capacidade de promover ionização e excitação nos meios, possuindo um alto poder de penetração (GROSH & HOOPYWOOD, 1979).

O possível uso da radiação como uma tecnologia capaz de criar imunógenos potencialmente úteis como vacinas é descrita desde os anos 50 (TAYLOR *et al.*, 1986). Tanto a radiação gama, os raios-X e a radiação ultravioleta têm sido convincentemente úteis na atenuação ou esterilização de agentes biológicos dos mais variados tipos. Em todos os modelos celulares estudados, a radiação promove

essencialmente a perda da capacidade reprodutiva, mantendo o potencial imunogênico adequado (WALES & KUSEL, 1992).

A radiação gama age por duas vias, na ação direta que decorre da transferência da energia para a molécula alvo, provocando ionização e modificação da estrutura química, gerando alteração na função biológica. Indiretamente e mais freqüentemente, a radiação age pela interação com a água do meio, molécula mais encontrada nos sistemas biológicos, formando hidrogênio molecular (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e vários radicais livres, como hidroxila ($OH^\bullet$), elétron aquoso (e^-_{aq}), átomo de hidrogênio ($H^\bullet$) e peroxila ($HO_2^\bullet$). Estes radicais interagem com moléculas biológicas, afetando estruturas celulares e ampliando os efeitos da radiação, devido ao seu potencial oxidante. (MICHAELS & HUNT, 1978).

Os ácidos nucléicos e as proteínas são as principais moléculas afetadas, no entanto a atividade enzimática das proteínas e lipídeos de membrana celular somente podem ser alterados com doses mais elevadas de radiação (BUTLER *et al.*, 1984). A radiosensibilidade depende da linhagem celular, e da capacidade de reparo dos danos provocados no DNA, que, quando irreversíveis, podem levar a morte celular. Esse fenômeno pode ser imediato, tanto por agressão a genes essenciais (SZUMIEL, 1994), como por indução de apoptose, via radical, em grupos celulares específicos (HAIMOVITZ-FRIEDMAN, 1998). No entanto, o dano mais freqüente só será evidenciado na próxima divisão celular, pela perda do contato das cromátides irmãs com o fuso mitótico (OKAZAKI, 1995).

Além da ação sobre os processos reprodutivos dos agentes ou indução de morte fisiológica, alguns fenômenos relacionados a alterações de proteínas induzidas pela ação direta da radiação ou através de radicais produzidos durante a radiólise da água são sugestivos de uma melhor resposta imunológica (PINHO *et al.*,

1995). Tal fato provavelmente decorre da oxidação das proteínas, levando a uma fagocitose preferencial por células imunes, através de receptores *scavenger* (CARDI *et al.*, 1998), sendo uma importante ferramenta para a produção de imunógenos.

Estudos com proteínas de venenos de serpentes, submetidas à ação da radiação gama, vêm demonstrando a eficiência do método como ferramenta na produção e melhora na qualidade de imunógenos, somado a vantagem de não adicionar novas moléculas a amostra durante o processo, como no caso do uso de agentes físicos ou químicos e à melhoria da antigenicidade de muitas proteínas (BAPTISTA *et al.*, 2006).

1.1.2 Radiação em parasitoses

Usualmente, a radiação é usada em altas doses apenas para esterilização de alimentos contaminados, porém vem sendo utilizada como ferramenta na tentativa de produção de imunógenos, contra diversas doenças parasitárias (ERICKSON & ORTEGA, 2006).

Candidatos vacinais utilizando parasitas irradiados já foram utilizados com bons resultados para helmintos (WALES & KUSEL, 1992). Ovos e miracídios de *Schistosoma mansoni*, foram isolados e irradiados com Cobalto-60 com doses de 5 a 2000 Gy, tanto os ovos irradiados como os miracídios nas doses de 10 a 500 Gy, não conseguiram se desenvolver, porém quando foi utilizada a dose de 5 Gy, 3,2% dos caramujos desenvolveram a infecção (ANTUNES *et al.*, 1971). Quando camundongos são imunizados com cercárias irradiadas (150 a 200 Gy), ocorre uma diminuição na carga de vermes de uma infecção desafio em até 90%, quando comparados com grupos não vacinados (RICHTER *et al.*, 1995).

Em protozoários, ao estudar o efeito da radiação, na dose de 200 Gy, em esporozoítos de *Eimeria tenella* (Protozoa;Coccidia), notou-se danos nos mecanismos nucleares e celulares de reprodução, resultando em esterilização do agente (GILBERT *et al.*, 1998).

Em outros modelos como *Trypanosoma cruzi*, a radiação apenas induziu a perda de infectividade em um processo dose-dependente (MARTINEZ-SILVA *et al.*, 1969). Entretanto, outros autores observaram que não houve proteção quando camundongos, que receberam parasitas irradiados, eram inoculados com formas sangüíneas virulentas não irradiadas (SALATA *et al.*, 1973). Camundongos imunizados com 1×10^8 formas/animal (3 doses) de *T. cruzi* irradiados com ^{60}Co , foram desafiados com 1×10^2 parasitas metacíclicos isolados de *Triatoma infestans* e em todos os animais houve uma diminuição da parasitemia (OKANLA *et al.*, 1982). Outro estudo realizado em bovinos, utilizando *Trypanosoma brucei*, demonstrou que esse animais imunizados com 10^7 formas dos parasitas irradiados a 600 Gy (^{137}Cs), conferiram proteção completa contra desafio com 10^3 parasitas não irradiados (MORRISON *et al.*, 1982).

Em plasmódios, parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, a imunização de voluntários humanos, com esporozoítos irradiados, induziu proteção parcial contra a infecção, mas sem proteção contra desafio com formas eritrocíticas (NUSSENZWEIG *et al.*, 1969). Esporozoítos de *Plasmodium berghei*, irradiados e criopreservados, foram inoculados em camundongos e apresentaram altos índices de proteção quando desafiados com as mesmas formas não irradiadas (ORJIH & NUSSENZWEIG, 1980). Foi possível observar também que esporozoítos irradiados foram capazes de invadir hepatócitos e se transformar em trofozoítos, mas com degeneração após essa fase, gerando imunidade semelhante à doença natural no

hospedeiro (SCHELLER *et al.*, 1995). Quando voluntários humanos foram submetidos a imunizações com esporozoítos de *P. falciparum* irradiados a 150 Gy, desenvolveram anticorpos e foram protegidos contra malária transmitida através de mosquitos (EGAN *et al.*, 1993).

Em *Toxoplasma gondii*, a radiação foi empregada inicialmente com o objetivo de eliminar a infectividade de cistos em carnes contaminadas (DUBEY *et al.*, 1986), ou formas infectantes como oocistos (DUBEY *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 1996a) em alimentos contaminados, porém, quando taquizoítos foram submetidos a doses de 200 Gy, foi observado que os taquizoítos irradiados promovem uma resposta de anticorpos similar a dos animais tratados, demonstrando que os parasitas irradiados nessa dose preservam suas características, além de inibir completamente a reprodução, sem danificar os processos de invasão celular e seu metabolismo basal, fornecendo em animais uma imunidade semelhante a infecção natural (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

Utilizando preparações de taquizoítos irradiados por via oral, foi observada a produção de imunoglobulinas IgG e IgA no soro de camundongos C57Bl/6j, similar a infecção crônica. Seu uso com adjuvantes anti-ácidos induziu produção de IgA fecal e menos significativamente de IgG fecal. Outro fato importante observado foi que as preparações orais induziram proteção quantitativa ao desafio dos animais imunizados por cepa cistogênica, que foi semelhante à imunização parenteral, quando o hidróxido de alumínio foi usado como adjuvante (GALISTEO JR. *et al.*, 2005). Todos estes dados demonstram o potencial uso da radiação ionizante no desenvolvimento de uma vacina para toxoplasmose, para uso em animais e principalmente em felinos domésticos e selvagens.

1.2 Toxoplasmose

1.2.1 Histórico

A toxoplasmose é uma doença de ocorrência mundial causada pelo protozoário *Toxoplasma gondi* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908). Este parasita se destaca por possuir uma estrutura própria ao filo chamada Complexo Apical, sendo esta responsável pela invasão nas células dos hospedeiros. O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, capaz de invadir e se multiplicar no interior de qualquer célula nucleada, sem distinção de tipo tecidual. A infecção se caracteriza na maior parte dos casos por uma fase inicial aguda de intensa replicação do parasita, seguida de uma fase crônica, assintomática em que o parasita se reproduz lentamente (DUBEY *et al.*, 1998a).

Este parasita foi descoberto independentemente e simultaneamente, em coelhos de laboratório no Brasil (SPLENDORE, 1908) e em roedores *Ctenodactylus gundi* na Tunísia (NICOLLE & MANCEAUX, 1908). Em 1912, durante o I Congresso de Patologia Comparada em Paris, Splendore dissertando sobre a toxoplasmose em coelhos predisse: “[...] nós não devemos ficar surpresos se esta doença for observada em seres humanos no futuro. [...] isto é o que indica nossas pesquisas e observações.”

No início a toxoplasmose foi constantemente confundida com outras parasitoses e apenas em 1923 ocorreu à primeira caracterização de infecção em humanos, com a descrição de cistos oculares em uma criança de 11 meses com hidrocefalia em Praga (JANKU, 1923). Em 1954, devido à observação da alta prevalência da infecção na população, sugeriu-se que a transmissão ocorria através

da ingestão de carnes malcozidas, o que foi confirmado por outros pesquisadores, os quais demonstraram a resistência dos cistos teciduais às enzimas proteolíticas dos sucos digestivos (JACOBS, 1967). Porém não se conhecia a forma principal de transmissão. Estudos com modelos de *Toxocara* em gatos mostraram que o *T. gondii* poderia ser transportado pelos ovos do verme (HUTCHISON, 1965). Apenas alguns anos depois esse fato foi totalmente compreendido, podendo-se então, dissociar a transmissão da toxoplasmose do sistema de helminto (FRENKEL *et al.*, 1969; SHEFFIELD & MELTON, 1969), sendo o oocisto, forma encontrada nas fezes do gato e a elucidação da fase sexuada do agente muito bem caracterizada em seguida (DUBEY *et al.*, 1970; MILLER *et al.*, 1972).

1.2.2 Ciclo de vida

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 1), tendo os felinos como hospedeiros definitivos e o homem e os demais animais de sangue quente considerados hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 1998a). O protozoário invade as células do intestino delgado dos felinos onde ocorre o ciclo enteroepitelial, caracterizado por reprodução sexuada do parasita, liberando oocistos nas fezes (FRENKEL *et al.*, 1970). O felino infectado pode excretar milhões de oocistos por dia, nas fezes, por até 10 dias de excreção (MEIRELES *et al.*, 2008).

A esporulação dos oocistos ocorre no meio ambiente após aproximadamente cinco dias em contato com o solo e o oxigênio do ambiente, resultando na formação de dois esporocistos, com quatro esporozoítos em cada um (WONG & REMINGTON, 1993). Após a ingestão de oocistos esporulados por hospedeiros intermediários ou novamente por felinos, através de água ou alimentos

contaminados, são liberados os esporozoítos, que invadem as células intestinais e se transformam em taquizoítos, forma assexuada do parasita e de proliferação rápida, que serão disseminados pela circulação aos outros tecidos onde invadirão as células nucleadas, havendo proliferação e reativação (DUBEY *et al.*, 1998a).

Outras formas menos freqüentes da aquisição da doença são através de transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais, transfusão de sangue de indivíduos na fase aguda da infecção e através da transmissão congênita (WEISS & KIM, 2007), como pode ser observada no ciclo abaixo.

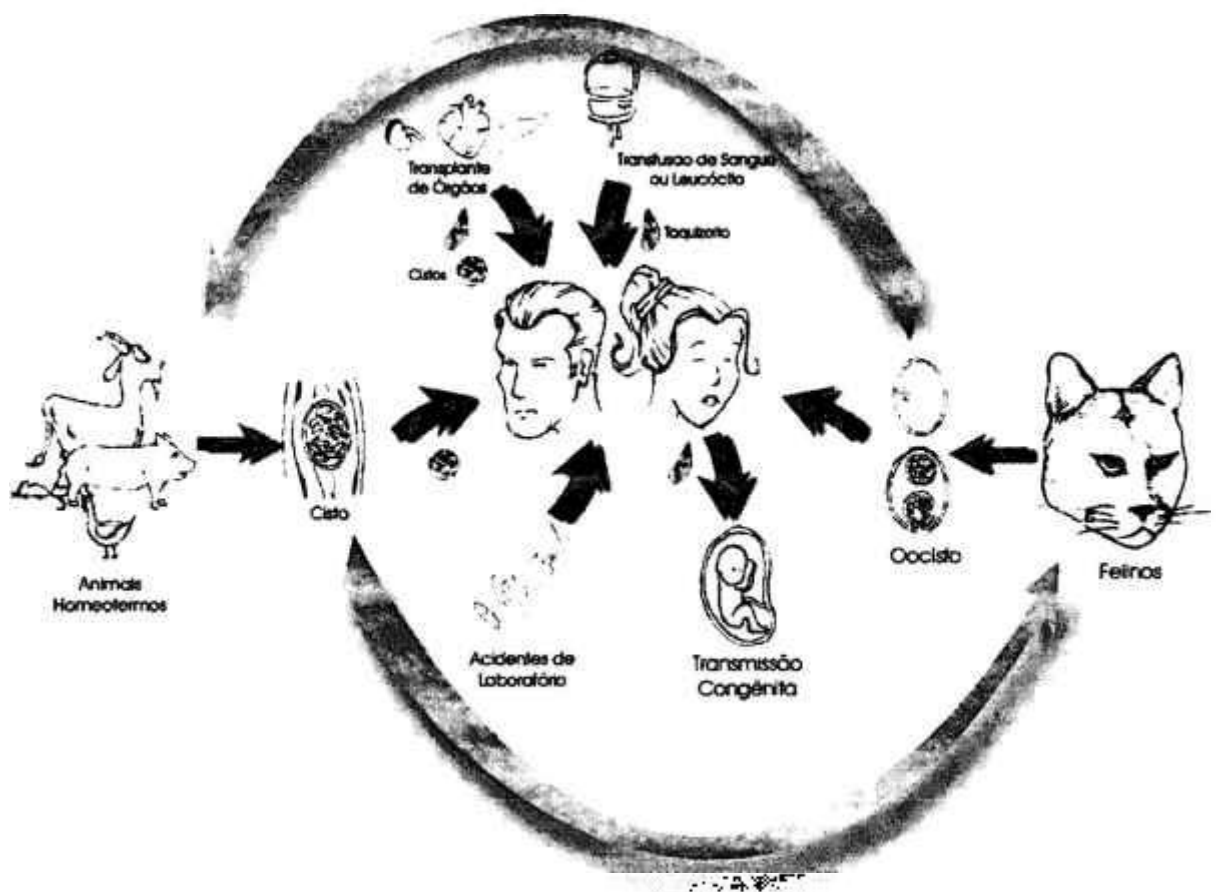


Figura 1 - Ciclo do *Toxoplasma gondii*, mostrando os hospedeiros definitivos (felinos), hospedeiros intermediários e suas várias vias de infecção (Foto: Andrés J. Galisteo Jr & Roberto M. Hiramoto; Desenhos: Rodrigo Righetto Jimenez).

Os taquizoítos apresentam diversas estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi e também apresentam organelas características do filo, complexo apical ou conóide, com anéis polares, roptrias e micronemas e grânulos densos. Estas formas de multiplicação rápida atingem o restante do corpo dos hospedeiros intermediários através do sangue e da linfa, multiplicando-se assexuadamente no interior das células por repetidas endodiogenias (WEISS & KIM, 2007).

As principais estruturas envolvidas na penetração são a superfície do agente e o complexo apical. Ao aderir-se à célula, através de receptores de superfície como SAG-1, o agente orienta seu complexo apical de forma a criar uma junção intracelular e formar na célula um vacúolo confortável para o agente (MAGNO *et al.*, 2005). Esta forma de invasão usa um mínimo de exposição de antígenos, o que dificulta o reconhecimento da resposta imune especialmente em vacinas com extrato total de baixa eficácia (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

Alguns taquizoítos, após a invasão da célula hospedeira desenvolvem-se mais lentamente transformando-se em bradizoítos, que preferencialmente vão formar cistos em células mais estáveis como no tecido cerebral, músculo esquelético e cardíaco (DUBEY *et al.*, 1998a).

Os cistos intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por longos períodos ou por toda a vida do hospedeiro sem causar a este nenhuma resposta inflamatória ou despertar resposta tecidual significativa (DUARTE & ANDRADE Jr., 2006). O destino dos cistos teciduais não é totalmente conhecido, mas se propõe que às vezes estes possam se romper durante a vida, liberando os bradizoítos que podem ser destruídos pelo sistema imune ou formar novos cistos (WEISS & KIM, 2007).

Estas formas ao serem ingeridas promovem uma nova infecção em uma via alternativa do ciclo, através da ingestão de carne crua e mal cozida, que contenha tais cistos (SIBLEY, 2003). A parede do cisto é dissolvida por enzimas digestivas e os bradizoítos liberados são capazes de penetrar nas células epiteliais do intestino, disseminando-se por todo o indivíduo no caso dos hospedeiros intermediários. Porém no caso dos hospedeiros definitivos ocorre a formação de oocistos que são excretados nas fezes contaminando assim o ambiente e outros animais (DUBEY, 1993).

1.2.3 Toxoplasmose em humanos e aspectos epidemiológicos

Em indivíduos imunocompetentes, a doença geralmente causa perturbações leves e temporárias, a toxoplasmose é uma infecção muito prevalente em inúmeras regiões do mundo com importância médica (REMINGTON *et al.*, 2005). A doença é geralmente controlada pela resposta imune do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, porém em alguns casos pode ocorrer o comprometimento ocular (ROBERTS & McLEOD, 1999). Esse comprometimento pode ser adquirido tanto na infecção congênita como na infecção adquirida após o nascimento (GLASNER *et al.*, 1992).

Em países como os EUA, a retinocoroidite é responsável por 30-50% de todos os casos de danos visuais (McCANNEL *et al.*, 1996). No Brasil, em estudo realizado na cidade de Erechim, 17,7% das pessoas examinadas apresentaram lesões oculares, sendo que a maioria dos casos foi detectada em indivíduos adultos, mostrando que a toxoplasmose ocular pode ser considerada uma seqüela da infecção aguda adquirida (GLASNER *et al.*, 1992).

Outro estudo realizado na cidade de Jaguapitã, no estado do Paraná, 82,9% dos indivíduos examinados apresentou positividade contra o *T. gondii*, e destes, 26,8% tiveram algum tipo de lesão ocular (GARCIA *et al.*, 1999). No estado do Rio de Janeiro, em Campos de Goytacazes, a prevalência de toxoplasmose ocular na área rural foi de 14% e na área urbana 8% (PETERSEN *et al.*, 2001).

Na comunidade indígena multiétnica em Iauareté, situada na bacia do Alto Rio Negro, a prevalência da reatividade foi de 73,5% da população mais jovem, aumentando com a faixa etária e atingindo 95,7% em indivíduos maiores de 50 anos (BÓIA *et al.*, 2008).

Um importante grupo afetado pela toxoplasmose é a de gestantes que nunca tiveram contato com o parasita e passam a adquirir a infecção durante a gestação, podendo através da transmissão transplacentária, ocasionar graves lesões ao feto (SABIN, 1941). A maioria dos recém nascidos infectados não apresenta sinais clínicos ao nascer, mas são freqüentes seqüelas da infecção congênita no decorrer da vida como coriorretinite, causando grave lesão ocular, a qual poderá culminar em cegueira, em casos extremos, além de epilepsia ou deficiência mental leve (REMINGTON *et al.*, 2005).

Nos EUA, ocorre cerca de 400 a 4000 casos por ano, acarretando enormes gastos com serviços médicos e uma queda na produtividade atribuível a toxoplasmose (HSU *et al.*, 1992; ROBERTS & FRENKEL, 1990). Em países da Europa como França e Áustria, estima-se que a cada 1000 nascimentos ocorram 3-4 casos de transmissão congênita da toxoplasmose (GRAS *et al.*, 2005).

No estado do Rio grande do Sul, foram analisados 140.914 recém nascidos, sendo possível determinar uma prevalência de 1 para cada 3000 nascidos vivos (NETO *et al.*, 2000). Em Campos de Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro, as

estatísticas são ainda maiores, sendo detectados 5 casos de toxoplasmose congênita para cada 2550 recém nascidos (PETERSEN *et al.*, 2001).

No estado de São Paulo (região metropolitana), estima-se que devam nascer cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano, cerca de uma a cada 1000 partos (GUIMARÃES *et al.*, 1993). Recentemente em um grupo de estudantes de uma escola em Jataizinho, no Paraná, 46.4% das crianças analisadas apresentaram positividade contra o *T. gondii* e estudos epidemiológicos associaram esses índices elevados à presença de gatos dentro do convívio familiar (LOPES *et al.*, 2008).

A toxoplasmose também pode afetar o grupo das pessoas que apresentam uma queda do sistema imunológico, como os portadores de HIV, os transplantados e os indivíduos em tratamento contra o câncer.

Em pacientes com AIDS, o parasita é responsável pelo desenvolvimento de uma variedade de sintomas, mas o mais freqüente é a encefalite, onde a rápida multiplicação dos taquizoítos resulta na destruição dos tecidos neurais. Nestes pacientes, um aspecto importante é a possível reativação da infecção devido aos cistos latentes, causada pela liberação de bradizoítos, que se transformam em taquizoítos provocando doença grave, principalmente lesões cerebrais (LUFT & REMINGTON, 1992).

Em países como a África, 50% dos indivíduos com AIDS desenvolvem encefalite devido à toxoplasmose (CLUMECK *et al.*, 1984). Nos EUA, dos pacientes com AIDS, cerca de 18 a 25% podem desenvolver toxoplasmose e apresentar alguma seqüela (KASPER & BUZONI-GATEL, 1998), gerando um gasto estimado de 23 a 106 milhões de dólares por ano em tratamento (ROBERTS *et al.*, 1994).

Em São Paulo, um levantamento realizado em 1988 e 1991 apresentou respectivamente 21% e 46% de encefalite por toxoplasma em pacientes com AIDS

(PASSOS *et al.*, 2000), sendo que a toxoplasmose é uma das principais causas associadas em mortes por AIDS, responsável por 12,2% dos óbitos (SANTOS *et al.*, 2000).

Pessoas que sofreram transplante de fígado, coração e medula óssea, também podem adquirir a toxoplasmose, podendo causar sérios problemas, inclusive levando a óbito (MAYES *et al.*, 1995). Na Europa, vários casos de pacientes que sofreram transplantes de células hematopoiéticas, apresentaram severas lesões e óbito (MARTINO *et al.*, 2000), em outro estudo com 655 pacientes que sofreram transplante de medula óssea, 24 pacientes apresentaram encefalite, dos quais 74% foram devido a toxoplasmose (MASCHKE *et al.*, 1999). No Brasil, no período de 1996 a 1998, de 97 transplantados cardíacos, quatro casos apresentaram infecção por *T. gondii*. (COUTO *et al.*, 2001).

A toxoplasmose também tem sido freqüentemente descrita em pacientes com câncer que estão sofrendo tratamento com quimioterápicos, onde se tem observado o aparecimento de coriorretinite associada com encefalite, bem como complicações em outros órgãos (DAGHER & LUCAS, 1996; ISRAELSKI & REMINGTON, 1993).

Além de todos os comprometimentos envolvidos na toxoplasmose, outros fatores devem ser levados em conta e se confirmados poderão representar um grande problema de saúde pública. Alguns grupos estudando comportamento animal (WEBSTER, 2007; HRDÁ *et al.*, 2000) e outros estudando comportamento humano (FLEGR *et al.*, 2007; LINDOVÁ *et al.*, 2006), notaram que os grupos infectados cronicamente pelo *T. gondii* podem apresentar modificações comportamentais, como alterações no superego e redução da performance psicomotora.

1.2.4 Toxoplasmose em animais

Recentemente demonstramos que em animais destinados ao consumo humano no Brasil, 9,6% dos suínos (SUARÉZ-ARANDA *et al.*, 2000), 11% dos bovinos, 17% dos caprinos e 31% dos ovinos (MEIRELES, 2001), apresentaram positividade para o *T. gondii*.

Especificamente na região metropolitana, gatos apresentaram 40% e cães errantes 50,5% de positividade para o *T. gondii*. Cães errantes apresentam um potencial importante na detecção da prevalência da toxoplasmose, pois podem ser considerados como sentinelas ambientais (MEIRELES, 2004).

Em outros países também são encontrados altos níveis de infecção como 30,9% em suínos da Holanda (VAN KNAPEN *et al.*, 1995) e 38,5% em ovinos no Uruguai (FREYRE *et al.*, 1999), o que demonstra a importância do consumo de carne como uma das fontes de contaminação humana, caso não haja cocção adequada do alimento (DUBEY, 1996b). Vários fatores estão envolvidos nas diferenças de positividade entre as espécies e regiões estudadas, mas o principal fator está relacionado com a forma de criação e alimentação fornecida durante a criação dos animais (SUARÉZ-ARANDA *et al.*, 2000).

Outra fonte possível e importante de contaminação é o leite e seus derivados, onde os parasitas de *T. gondii* permanecem viáveis por 20 dias no leite a 4°C e resistindo inclusive aos processos de manufatura do queijo, permanecendo viáveis por um período de 10 dias nas mesmas condições (HIRAMOTO *et al.*, 2001).

Os animais destinados ao consumo humano quando atingidos pela toxoplasmose, além de servirem como fontes de contaminação, também representam prejuízos econômicos aos seus criadores, devido a abortos e mortes

neonatais (BUXTON, 1998). Estima-se no Uruguai perda de 1,4-3,9% dos ovinos em fase gestacional, com um prejuízo em torno de US\$ 1,4-4,7 milhões de dólares (FREYRE *et al.*, 1999).

1.3 Imunidade na toxoplasmose

Os mecanismos de defesa do hospedeiro exercem um papel crucial no controle da atividade do *T. gondii*. Na fase inicial da infecção ocorre o processo de reconhecimento antigênico e ativação do sistema de defesa específica. O amadurecimento da resposta imunológica específica inibe eficientemente a replicação do *T. gondii*, porém não é capaz de destruí-lo. O parasita por sua vez apresenta mecanismos de escape do sistema imune, assumindo uma forma de baixa imunogenicidade formando cistos em tecidos, os quais se mantêm viáveis por toda a vida do hospedeiro (LANG *et al.*, 2006).

O papel das células B na infecção pelo *T. gondii*, não é totalmente esclarecida. A resistência à infecção está associada a um aumento na produção de anticorpos específicos, principalmente da subclasse IgG2a em camundongos. Os anticorpos persistem durante a vida do hospedeiro, mas seu papel permanece controverso, devido ao caráter intracelular do *T. gondii*. *In vitro*, anticorpos contra proteínas específicas (SAG1, GRA2 e GRA6), demonstraram ser eficientes no bloqueio da invasão dos parasitas (CHA *et al.*, 2001), sendo que o mesmo efeito não foi observado *in vivo*, através da transferência passiva de anticorpos específicos, demonstrando a pouca eficiência protetora dos anticorpos, nos modelos estudados (PAVIA, 1986). Em modelos recentes, utilizando camundongos deficientes em células B, mas produtores de IFN- γ , foi possível observar um aumento na

sensibilidade a infecção aguda em relação aos animais selvagem (KANG *et al.* 2000). Neste mesmo modelo a transferência de linfócitos B sensibilizados (CHEN *et al.*, 2003a) ou anticorpos específicos (KANG *et al.*, 2000) restaurou a resistência a infecção.

O controle da infecção pelo *T. gondii* também é mediado por células, onde a ativação dessa defesa está relacionada com tipos celulares especializados que interagem entre si através da expressão de antígenos de superfície, de mediadores específicos (citocinas) e sua interação com receptores específicos. Desta maneira, a avaliação do perfil das citocinas produzidas durante a infecção, fornece evidências a respeito do grau e forma de ativação da imunidade celular.

Diferentes perfis na produção de citocinas são observados durante distintas formas de infecção, resultando em diferentes respostas efectoras. A partir deste comportamento, padronizou-se um conceito de paradigma das respostas do tipo Th1 e Th2. A resposta do tipo Th1 envolve células T helper e citotóxicas mediadas por citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α que são produzidas por infecções intracelulares. Já a resposta do tipo Th2, com produção preferencial de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, é dirigida a infecções extracelulares. As respostas Th1 e Th2 são contrabalanceadas por mecanismos de inibição, desta forma, citocinas Th1 inibem a expressão de citocinas Th2 e a ausência da estimulação Th1 levaria a produção da resposta Th2 (JANKOVIC *et al.*, 2001; SZABO *et al.*, 2003).

Na toxoplasmose, a principal citocina envolvida na resistência da infecção é o IFN- γ , o que demonstra ser uma resposta preferencialmente voltada para o tipo Th1. Sua produção é realizada por células T CD4⁺ e NK, sendo principalmente regulada pela produção de IL-12. Esta citocina é responsável pelo aumento da capacidade fagocítica contra o *T. gondii*, aumento da expressão de MHC classe II em células T e

também tem um importante papel na indução da conversão de taquizoítos para bradizoítos (BOHNE, *et al.*, 1993). Esse efeito protetor do IFN- γ , apresenta mecanismos regulatórios ainda desconhecidos, porém sabe-se que linhagens de camundongos suscetíveis e resistentes à toxoplasmose, apresentam níveis séricos diferentes, sendo mais elevados em animais suscetíveis (McLEOD *et al.*, 1989). Concentrações mais exacerbadas de IFN- γ estão relacionadas com infecções letais causadas por isolados de *T. gondii* altamente virulentos (MORDUE *et al.*, 2001).

Dentre as citocinas regulatórias a IL-10 é uma das citocinas mais importantes envolvidas no controle do efeito Th1 durante a toxoplasmose aguda (GADDI & YAP, 2007). Sabe-se que a IL-10 tem papel inibitório sobre outras citocinas como: IL-2, IFN- γ e TNF- α , inibindo a resposta Th1, por supressão da IL-12 (O'GARRA & VIEIRA, 2007). Além das citocinas já descritas, outras podem participar da resposta imune contra o *T. gondii*, como IL-1, IL-2, GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos), IL-4 e IL-5 (BEAMAN *et al.*, 1992).

IL-4 é uma citocina principalmente produzida por linfócitos Th2, e em menor por basófilos e mastócitos. Seu principal papel é a diferenciação de células T para o perfil Th2, bem como proliferação de linfócitos B. O seu papel é desfavorável durante a fase aguda da infecção, onde na ausência de IL-4, ocorre uma maior sobrevivência dos animais infectados e diminuição de lesões intestinais (NICKDEL *et al.*, 2004). O papel da IL-4 é muito dependente do modelo usado, incluindo as linhagens de camundongos naturalmente resistentes ou suscetíveis a infecção e grau de virulência da cepa do parasita utilizada.

1.3.1 Sistema imune das mucosas na toxoplasmose

Os avanços feitos na área do estudo e o entendimento do sistema imunológico das mucosas nos últimos anos tem sido de extrema importância para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelo equilíbrio e relação entre saúde e doença. A mucosa intestinal possui particularidades muito interessantes do ponto de vista imunológico, onde, além das estratégias de defesa à entrada de patógenos, também apresenta um papel importante no reconhecimento e conseqüentemente na tolerância às proteínas alimentares e a microorganismos da flora comensal.

O sistema imune de mucosas ou MALT (mucosa-associated lymphoid tissues) contribui com cerca de 80% de todas as células imunes, formando o maior sistema linfóide mamífero (HOLMGREN & CZERKINSKY, 2005). É composto de agregados de linfócitos, macrófagos, e outras células acessórias localizadas abaixo do epitélio mucoso, bem como linfócitos intra-epiteliais difusamente espalhados (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000). As placas de Peyer são agregados anatomicamente definidos de tecido linfóide associado à mucosa, na lâmina própria do intestino delgado. O epitélio intestinal ao redor das placas de Peyer é especializado de modo a permitir o transporte de antígenos para o tecido linfóide e esta função é realizada por células epiteliais, denominadas células M. Essas últimas são capazes de capturar e internalizar antígenos, permitindo posteriormente, que células apresentadores de antígenos, processe esse material e apresente às células linfóides subepiteliais, desenvolvendo uma resposta imune local (BRAYDEN *et al.*, 2005).

A necessidade de permeabilidade da superfície das mucosas cria uma vulnerabilidade a certas doenças e sua importância como principal via de entrada,

ainda não é totalmente entendida. As células intestinais entram em contato com o parasita durante a penetração intestinal e fornecem a primeira linha de defesa contra a invasão, envolvendo mecanismos celulares e humorais (KASPER *et al.*, 2004). Toda a caracterização das estruturas e a dinâmica de invasão pode ser observada na Figura 2.

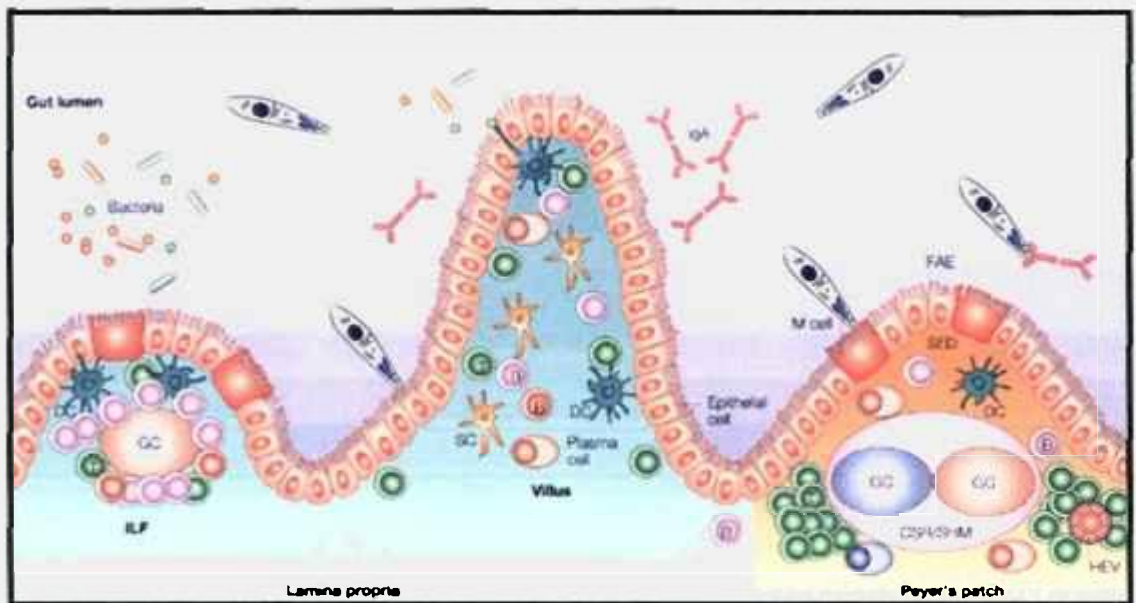


Figura 2 – Representação esquemática da mucosa intestinal e as vias de invasão do *T. gondii*. GC - Centro germinativo; DC - Células dendríticas; FAE – Epitélio associado ao folículo (Foto: FAGARASAN & HONJO, 2003, modificado por Andrés Jimenez Galisteo Jr.)

A infecção pelo *T. gondii* é iniciada pela invasão dos enterócitos pelo parasita após a ingestão de cistos ou oocistos. A resposta inflamatória começa localmente na mucosa intestinal sendo, em seguida, disseminada por todo o corpo do hospedeiro. A infecção dos enterócitos pelo parasita desencadeia a produção das quimiocinas MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 e RANTES que rapidamente recrutam células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, células T, NK e células dendríticas para

os sítios de infecção (DENKERS *et al.*, 2004; KASPER *et al.*, 2004). As células inflamatórias ativadas passam a secretar citocinas, que ampliam o recrutamento celular e produzem também citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12). As células inflamatórias, ativadas pelo IFN- γ e TNF- α , empenham na toxoplasmose, um controle na replicação parasitária (SIBLEY *et al.*, 1991). Muitos mecanismos para esse controle são descritos, como mecanismos oxidativos (MURRAY & COHN, 1979), produção de nitratos que interferem em enzimas metabólicas essenciais do parasita (SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 1997), ativação de indoleamina 2,3 deoxigenase, responsável pela degradação do triptofano e essencial para a sobrevivência do parasita (SILVA *et al.*, 2002) e produção de proteínas GTP, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido (COLLAZO *et al.*, 2001).

Evolutivamente a mucosa intestinal se adaptou também com outros mecanismos muito particulares, como o peristaltismo, produção de muco e produção de anticorpos específicos que são liberados na luz intestinal. A imunoglobulina associada com o sistema de mucosas é a IgA secretora (S-IgA). No sangue, a IgA aparece como monômero, enquanto que nas mucosas ela é principalmente um dímero. IgA secretora gerada por transporte mediado por p-IgR (receptor de Ig polimérica) que bloqueia a adesão de microorganismos na mucosa, sendo a primeira linha no reconhecimento e defesa contra os patógenos (WEINER, 2001).

A infecção pelo *T. gondii* provoca um aumento na produção de anticorpos específicos, preferencialmente S-IgA contra o parasita no intestino. Ensaios demonstraram que essa imunoglobulina pode inibir a infecção de enterócitos *in vitro* (MACK & McLEOD, 1992). Os linfócitos intra-epiteliais (IEL) do intestino participam da resposta imune através da liberação de várias citocinas como IL-2, IL-3, IL-5, TNF- α e IFN- γ . A transferência de IEL (CD8⁺) de camundongos infectados protege

animais desafiados por via oral, prevenindo a infecção aguda e a mortalidade (BUZONI-GATEL *et al.*, 1997) e induzindo proteção por longos períodos (LEPAGE *et al.*, 1998).

Como podemos notar, a principal via de acesso de inúmeros parasita é a via oral, portanto o epitélio intestinal, ao mesmo tempo em que serve como porta de entrada, deve promover uma barreira fisiológica e imunológica contra microrganismos e substâncias estranhas, sendo o principal local de defesa do organismo. Em geral, este sistema imune de mucosa é homeostático, apesar da considerável carga antigênica presente no intestino (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006).

1.4 Vacinas para toxoplasmose

Até o momento não existe nenhuma vacina comercial para a toxoplasmose humana, que previna a infecção congênita, ou a formação e reativação de cistos (GOTTSTEI, 1995). Foram testados diversos esquemas de imunização contra o *T. gondii* em animais, como antígenos isolados, parasitas inativados e cepas mutantes (ARAÚJO, 1994), porém os resultados obtidos não apresentaram níveis de proteção satisfatórios e até mesmo em alguns casos houve o comprometimento do sistema de defesa do agente.

Pelas dificuldades de crescimento do parasita, muitos grupos direcionaram seus estudos para o desenvolvimento de uma vacina utilizando proteínas recombinantes. Tentativas utilizando apenas uma proteína recombinante não apresentaram resultados divergentes, provavelmente pela limitação da ação dos anticorpos gerados por essas imunizações (VELGE-ROUSSEL *et al.*, 1994). Camundongos BALB/c, imunizados por via intranasal, com proteínas recombinantes

rROP2, rGRA5 e rGRA7, associadas com toxina colérica, apresentaram proteção parcial quando desafiados com cistos da cepa VEG (IGARASHI *et al.*, 2008). Experimentos utilizando SAG3 recombinante, na presença de Quil A, também apresentaram proteção parcial quando BALB/c imunizados foram desafiados com cepa ME49 (LEE *et al.*, 2007). Até o momento todas as tentativas de imunizações com proteínas híbridas não apresentaram resultados satisfatórios, sugerindo que a eficiência da imunização provavelmente esteja relacionada com uma apresentação mais semelhante dos antígenos do *T. gondii*.

Existe neste momento apenas uma única vacina comercial para uso em ovelhas (TOXOVAX®), que está disponível na Grã Bretanha e Nova Zelândia, e utiliza taquizoítos da cepa S-48, que não persistem nos tecidos dos animais, reduzindo a perda de fetos (BUXTON, 1993) e apresentando uma proteção de 70%, porém com uma enorme dificuldade na logística da entrega das unidades vacinais em localidades mais distantes.

A vacina ideal contra a toxoplasmose deve prevenir a infecção humana, e os alvos vacinais deverão ser os felinos, que são os responsáveis pela disseminação ambiental de oocistos que contaminam o homem e os animais de produção, cuja carne é fonte de contaminação. Este ciclo poderá ser interrompido se os gatos puderem ingerir a vacina efetiva por via oral em iscas ambientais, protegendo de qualquer infecção por presas contaminadas, interrompendo a rede causal da toxoplasmose, além de ser a via mais fácil de administração. No caso de animais carnívoros o uso de iscas como veículo para distribuição de imunógenos vem sendo utilizada com sucesso há alguns anos na vacinação contra a raiva (RABORAL VR-G®). Esta vacina produzida nos Estados Unidos, utilizando um vetor viral já é utilizada a mais de dez anos. Estas iscas são produzidas com carne de peixe e

distribuídas em grandes áreas para a imunização de cães, gatos, raposas entre outros animais com efetiva segurança e resultados eficazes, contribuindo com o controle da raiva em muitos países (MACKOWIAK *et al.*, 1999).

Para este fim é fundamental entendermos o papel da imunidade de mucosa na toxoplasmose e imunizações por via oral necessitam de estudos mais detalhados, pois mimetizam a rota natural de entrada de diversos parasitas no hospedeiro, principalmente *T. gondii* e o uso da radiação ionizante pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de uma vacina para uso comercial em animais, principalmente gatos, diminuindo assim a transmissão da toxoplasmose.

II OBJETIVOS

Geral

Estudar a imunidade sérica e intestinal contra o *T. gondii* em camundongos, induzida por taquízoitos irradiados com 255Gy, do ponto de vista celular e humoral.

Específicos

Avaliar a funcionalidade celular do parasita, após o trânsito estomacal, em camundongos imunizados por via oral.

Avaliar a produção de IgG, IgA e IgM sérica, em camundongos imunizados por via oral ou parenteral

Determinar as diferenças na produção de subclasses de IgG sérica em camundongos imunizados por via oral ou parenteral

Avaliar a maturação e diferenças da avidéz de IgG em camundongos imunizados por via oral ou parenteral.

Avaliar a excreção fecal de IgG, IgA e IgM em camundongos imunizados por via oral ou parenteral.

Determinar as diferenças de expressão das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos e células intestinais, de camundongos imunizados por via oral e parenteral.

Avaliar a diferença de proteção induzida em animais imunizados por via oral ou parenteral, com desafio com cepa cistogênica.

Avaliar o comportamento e sobrevivência, em animais deficientes de IFN- γ , quando imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*.

Determinar e quantificar a produção sérica das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, em animais IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados por via oral ou parenteral.

Avaliar e quantificar a excreção nas fezes das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, em animais IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados por via oral ou parenteral.

III MATERIAL E MÉTODOS

Todos os sais e demais reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise sendo a água deionizada purificada em sistema Milli-Q[®] (Millipore[®]), apresentando resistividade de 18,2 mega Ω . Reagentes específicos têm sua fonte citada ao longo do texto.

3.1 Parasitas.

Os parasitas utilizados nos ensaios são mantidos rotineiramente no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (USP - Universidade de São Paulo).

3.1.1 Cepas RH (*virulenta*).

Taquizoítos da cepa RH (ATCC nº 50174) são mantidos por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss ou C57Bl/6j. Os animais previamente infectados são sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ e o peritônio lavado com solução salina ou solução salina tamponada com fosfato – NaCl 0,15 M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS), contendo Penicilina Cristalina 2500 UI/mL e Estreptomicina 10 mg/mL.

Após quantificação em câmara de Neubauer, os taquizoítos são inoculados (i.p) em novos animais.

3.1.2 Cepa ME49 (cistogênica).

Cistos da cepa ME49 (ATCC nº 50611) utilizada no desafio dos animais imunizados foram gentilmente cedidos ao laboratório pelo Prof. Dr. Fausto Araújo, (UCLA - University of California, Los Angeles). Esta cepa é mantida através de sucessivas passagens, com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos Swiss ou C57Bl/6j. Cada animal foi inoculado por via oral (v.o), com uma suspensão de 10 cistos/animal, obtida após macerado de cérebro de camundongos previamente infectados, com 3,0 mL de PBS pH 7,2 estéril.

Para a quantificação dos cistos, 25 µL da suspensão cerebral foram colocados entre lâmina e lamínula e observados ao microscópio de luz, sob objetiva de 40X, com determinação do número de cistos por cérebro analisado.

3.2 Animais experimentais.

Para os experimentos de imunização e desafio utilizamos camundongos machos C57Bl/6j e BALB/c (isogênicos), todos com peso variando entre 20 e 22g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP. Foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada, recebendo ração comercial Nuvital® e água *ad libitum*.

Para alguns experimentos também utilizamos camundongos C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$, cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos (CEMIB/UNICAMP) ao biotério do IPEN.

Todos os animais utilizados foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a manipulação dos mesmos foi conduzida de acordo com as normas de cuidados de animais de laboratório (Clark, 1996) e com os "Princípios de ética em

experimentação animal” (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Nosso projeto também foi submetido e recebeu a aprovação pela Comissão de ética em pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3.3 Irradiação dos taquizoítos de *T. gondii*.

Para a obtenção das preparações vacinais, utilizamos taquizoítos previamente purificados de *T. gondii* da cepa RH. Esses parasitas foram retirados de animais previamente infectados, através da lavagem peritoneal com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma®) e mantidos em banho de gelo durante todo o processo.

Esses parasitas foram então quantificados e submetidos à irradiação, na dose de 255 Gy com blindagem de 90%, pela exposição a raios γ de uma fonte de ^{60}Co (GAMMACELL®, Atomic Energy of Canada, Ltd.), de forma homogênea, com uma taxa de dose de 3,84 KGy/h, em temperatura ambiente e na presença de oxigênio (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

O grupo controle permaneceu na parte externa da fonte durante todo o tempo de irradiação, para avaliação das condições ambientais. Após a irradiação a viabilidade das amostras foi determinada utilizando o corante Azul de Tripiano, sendo utilizados apenas lotes com viabilidade maior de 95%.

Após a irradiação foi acrescentado, soro fetal bovino inativado (volume final 50%) e 5% DMSO volume final (Synth®), e em seguida aliquotados no volume de 1 mL (concentração final 1×10^8 taquizoítos/mL) em tubos plásticos de congelamento e mantidos à temperatura de -70 °C durante 24 horas e após transferidas para o nitrogênio líquido (-196 °C), onde permaneceram até o momento do uso. O mesmo

procedimento foi realizado com os parasitas não irradiados e utilizados como controle.

3.4 Imunização dos animais.

Camundongos C57Bl/6j, BALB/c e C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ foram divididos em grupos de 5 animais, imunizados com três doses de 1×10^7 parasitas/animal a cada 15 dias, com taquizoítos irradiados a 255 Gy, por via parenteral ou por via oral utilizando sonda gástrica e tendo como veículo hidróxido de alumínio (anti-ácido) (v/v). A adição de hidróxido de alumínio foi empregada para aumentar a viabilidade dos parasitas até a mucosa intestinal dos animais. Como grupos controle foram utilizados animais infectados com parasitas não irradiados, que receberam a mesma carga parasitária pelas mesmas vias de inóculos.

3.5 Obtenção do antígeno de *Toxoplasma gondii*.

Os parasitas obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente inoculados foram inicialmente filtrados em membrana de polycarbonato de 3.0 μm (ISOPORE™, Millipore®) para remoção de outros tipos celulares presentes após o lavado.

Os parasitas purificados foram submetidos à sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA), a 40 ciclos por 5-10 períodos de 30 segundos, em banho de gelo, até a lise completa dos agentes. Em seguida, acrescentou-se solução de NaCl 0,3 M para isotonzar a suspensão, e após, submetido a

centrifugação a 10000g por 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno (CAMARGO *et al.*, 1978).

A proteína total foi determinada utilizando o método de Bradford, tendo gama-globulina humana como padrão (BRADFORD, 1976). O antígeno foi aliquotado e mantido à -80 °C até o momento do uso nos ensaios.

3.6 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal.

Animais previamente imunizados por via oral com 10^7 parasitas com hidróxido de alumínio, foram sacrificados em diferentes tempos após inóculo. Segmentos iniciais do intestino delgado foram retirados e adicionados em 1,0 ml de aldeído glutárico a 1,5% com PBS e mantidas a 4 °C.

Em seguida as amostras foram misturadas a 20 µL de gelatina 2% diluída em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e gelificados. O material foi novamente tratado com aldeído glutárico 1,5% + paraformaldeído 1% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,08 M pH 7,4 + 2,5% de sacarose por 2 horas a 4 °C com agitação de 5 em 5 minutos. As amostras foram contrastadas em tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 2 horas e posteriormente lavadas em solução fisiológica e deixadas em acetado de uranila por 18 horas, sendo então desidratadas e incluídas em resina Araldite®. Cortes ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico ZEISS® EM-10-9 e micrografados (DUARTE *et al.*, 1992).

3.7 Obtenção das amostras de soro dos animais imunizados.

As amostras de sangue dos animais foram obtidas, semanalmente, por secção leve da extremidade da cauda e coletadas em papéis de filtro, com diâmetro de 5 mm (~5 µL) e estocadas secas a -20 °C. Antes do uso, o soro foi extraído com 100 µL de PBS sobre o papel por 18 horas a 4 °C, sendo o eluato do papel considerado numa diluição 1/100 do soro.

3.8 Detecção de anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro dos animais imunizados, por ELISA.

Placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL (10 µg/mL) de antígeno salino de *T. gondii*, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, por 20hs à 4 °C em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) por 5 minutos e bloqueadas com PBST + 3% leite desnatado (Molico®), durante 1 hora em estufa a 37 °C.

Após bloqueio, as amostras de soros (100 µL/poço), foram depositadas nas placas e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após quatro novas lavagens com PBST, foram aplicados 100 µL por poço de diluições de conjugado anti-IgG (1/20000), anti-IgA (1/10000) ou anti-IgM (1/5000) de camundongo, conjugado a peroxidase (Sigma®), com incubação por 1 hora a 37 °C. Após lavagens, a revelação da reação foi realizada pela adição de OPD (1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5,0) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCl 4 N.

As leituras das densidades ópticas (D.O.) foram realizadas em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS®) a 492 nm (VENKATESAN &

WALKELIN, 1993). Os resultados foram expressos arbitrariamente em índice de reatividade (IR) seguindo a fórmula:

$$IR = \frac{\text{D.O da amostra}}{\text{D.O. do animal negativo}}$$

3.9 Determinação das subclasses de IgG em camundongos C57Bl/6j e BALB/c.

A análise das subclasses nos soros dos animais imunizados foi realizada através de ELISA, como já descrito anteriormente. Para a determinação das subclasses foram utilizados 100 µL por poço de conjugado anti-IgG1, anti-IgG2a ou anti-IgG2b de camundongo, conjugado a peroxidase (Southern Biotechnology Associates®), diluído 1/2000 em PBS, e incubado por 1 hora a 37 °C. Após seis lavagens, a revelação da reação foi realizada pela adição de OPD (1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0) e interrompida após 30 minutos pela adição de ácido cítrico 0,2 M.

A leitura das densidades ópticas foi feita em leitor automático de microplacas a 450 nm (Dynatech MR4000®). Os resultados foram expressos arbitrariamente em índice de reatividade (IR), como já descrito anteriormente.

3.10 Obtenção da suspensão fecal dos animais imunizados.

Amostras de fezes dos camundongos, imunizados via oral e via intraperitoneal, foram coletadas três vezes por semana por todo o período da imunização, com determinação prévia do peso das amostras.

Os cíbalos dos animais foram macerados e homogeneizados em 5 mL de solução de PBS + PMSF (2 mM). Em seguida foram centrifugadas a 12000 *g* por 15 minutos para a separação da fase sólida. O sobrenadante foi então estocado e mantido a -80 °C (Li *et al.*, 2001).

Para concentração dos anticorpos o *pool* de extrato fecal, separado semanalmente, foi mantido em banho de gelo e adicionado o mesmo volume de tampão borato de sódio (0,1 M pH 7,4) em seguida foi lentamente acrescido sulfato de amônia saturado (v/v). O material foi em seguida centrifugado por 20 minutos a 4000 *g* a 4 °C. Após esse processo o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em PBS + PMSF (2 mM). As amostras permaneceram estocadas à -80 °C até o momento do ensaio (HUDSON & HAY, 1989).

3.11 Detecção de anticorpos IgG, IgA e IgM, nas suspensões fecais, por ELISA.

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL (10 µg/mL) de antígeno salino de *T. gondii*, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, por 20hs à 4 °C em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,02% de Tween 20 (PBST) por 5 minutos e bloqueadas com PBST + 3% de leite desnatado (Molico®), durante 1 hora em estufa a 37 °C. Após bloqueio, as amostras de extratos fecais (100 µL/poço), foram depositadas nas placas e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após quatro novas lavagens com PBST, foram aplicados 100 µL por poço de diluições de conjugado anti-IgG (1/20000), anti-IgA (1/10000) ou anti-IgM (1/5000) de camundongo, conjugado a peroxidase (Sigma®), com incubação por 1 hora a 37 °C. Após lavagens, a revelação da reação foi

realizada pela adição de OPD (1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5,0) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCl 4 N.

As leituras das densidades ópticas (D.O.) foram realizadas em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS®) a 492 nm (VENKATESAN & WALKELIN, 1993). Os resultados foram expressos arbitrariamente em índice de reatividade.

3.12 Avaliação da expressão relativa de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, em esplenócitos e células intestinais de animais imunizados, por *Real-Time* PCR.

3.12.1 Obtenção dos esplenócitos e células intestinais.

As células esplênicas e intestinais foram obtidas de camundongos imunizados e não imunizados. As células foram retiradas de maneira estéril em fluxo laminar, sendo as células esplênicas e intestinais (placas de Peyer) dissociadas em peneira de aço inoxidável (mesh 50) (Sigma®) na presença de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 100 U/mL Penicilina, 100 μ g/mL Estreptomicina e 0,25 μ g/mL Anfotericina B. No caso das células esplênicas, para remoção das hemácias foi utilizada uma solução de cloreto de amônio adicionado em igual volume, e então centrifugados a 1500 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

As células intestinais e os esplenócitos foram contados em câmara de Neubauer e ajustadas para concentração 2×10^7 células/mL, em RPMI 1640 com 10% de SFB e antibióticos. As células foram então distribuídas em placas de cultura sensibilizadas numa concentração de 2×10^6 células/poço e foram mantidas em

estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 48 horas, na presença de antígeno de *T. gondii* (10 µg/mL).

3.12.2 Extração e quantificação de RNA.

Após esse período as células foram homogeneizadas no reagente Trizol[®] (Invitrogen[®]) e mantidas até o momento da extração a -80 °C. O RNA foi extraído seguindo as especificações do fabricante sendo suas concentrações determinadas por leitura da absorbância a 260, 280 e 320 nm em espectrofotômetro Ultrospec300[®] (Pharmacia Biotech[®]).

3.12.3 Síntese de cDNA.

As bibliotecas de cDNA foram sintetizadas por transcrição reversa a partir de 5 µg de RNA total utilizando M-MLV RT e Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen[®]). As amostras de cDNA foram mantidas em freezer -20 °C até a realização dos ensaios de *real-time* PCR.

3.12.4 Confecção dos primers e eficiência de detecção.

Todos os primers utilizados foram desenhados utilizando o software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e as seqüências obtidas no banco de dados NCBI Nucleotide Databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para utilização no ensaio de *real-time* PCR, todos os *primers* foram testados e as reações padronizadas, sendo a eficiência da reação determinada pela fórmula:

$$E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

Todos os primers utilizados apresentaram eficiência igual ou superior a 90%, como pode ser observado na tabela abaixo:

Tabela 1: Seqüência dos *primers* para IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e β -actina e respectiva eficiência da reação obtida na padronização do *real-time* PCR.

Primers		Seqüências	Produto (bp)	Eficiência
IFN- γ	Sense	5'-GTCCAGCGCCAAGCATTCAA-3'	391	90%
	Antisense	5'-GTCCCCCAGCCCCAGATACA-3'		
IL-2	Sense	5'-TGGAGCAGCTGTTGATGGAC-3'	363	93%
	Antisense	5'-GAGGGCTTGTTGAGATGATGCT-3'		
IL-4	Sense	5'-ACCCCCAGCTAGTTGTCATC-3'	307	94%
	Antisense	5'-CGAAAAGCCCGAAAGAGTC-3'		
IL-10	Sense	5'-CTCAGTTCCATTCTATTTATTCAC-3'	336	92%
	Antisense	5'-GGATCTCCCTGGTTTCTCTTC-3'		
β -actina	Sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	349	91%
	Antisense	5'-TAAACGCAGCACAGTAACAGTCCG-3'		

3.12.5 Condições da reação e análise dos resultados.

Os ensaios de *real-time* PCR foram realizados no ABI Prism 7300 Sequence Detection System[®] (Applied Biosystems[®]), utilizando Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) seguindo protocolo do fabricante. O termociclador foi programado para realizar 95 °C por 10 minutos, 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto e seguido de um passo de denaturação. Os resultados foram expressos em valores de Ct (*cycle threshold* – número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção). Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Para a análise quantitativa foi adotada a mesma quantidade de cDNA em

todas as reações e utilizou-se a média dos valores de Ct obtidos das duplicatas. Para o cálculo da expressão gênica relativa foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o valor do $\Delta\Delta Ct$ foi obtido pela diferença entre o ΔCt dos animais imunizados e o ΔCt dos animais do grupo controle, como descrito por LIVAK *et al.*, 2001.

3.13 Desafio dos animais imunizados e quantificação do número de cistos.

Para a obtenção dos cistos de *T. gondii*, foram utilizados camundongos C57Bl/6j cronicamente infectados com cepa ME49. Os cérebros dos animais foram retirados e homogeneizados em Hank's (HBSS) com 30% de dextran, centrifugados a 3000 g a 4 °C por 10 minutos e o *pellet* re-suspenso em HBSS, a quantidade de cistos foi verificada por microscopia óptica convencional (BOOTH *et al.*, 1996).

Os camundongos imunizados foram desafiados após 15 dias da última dose com 10 cistos (v.o). Grupos controles, com camundongos não imunizados, foram inoculados com as mesmas quantidades de cistos. A mortalidade dos animais foi acompanhada diariamente e após um período de 30 dias, os camundongos foram sacrificados, por narcose com CO₂, e os cérebros homogeneizados em solução fisiológica (3mL), sendo uma alíquota (25µL) colocada entre lâmina e lamínula. O número de cistos foi determinado por microscopia óptica convencional e o resultado expresso em cistos/cérebro.

3.14 Análise estatística.

Todas as análises estatísticas foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 3.0.

A análise de sobrevivência dos animais foi feita utilizando a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, com comparações duas a duas.

A comparação do número de cistos cerebrais entre os grupos de animais imunizados foi feita utilizando o teste ANOVA (Análise de variância), com comparação por Bonferroni, para identificação da diferença entre os grupos.

IV RESULTADOS

4.1 Microscopia eletrônica da mucosa intestinal de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*.

Para o estudo da integridade do preparado vacinal, através do trato digestivo, realizamos a avaliação por microscopia eletrônica, como descrita em métodos.

Podemos notar que após a administração por via oral dos parasitas irradiados, não foi observado comprometimento da integridade da mucosa intestinal com total ausência de focos de inflamação ou necrose. A integridade das microvilosidades e dos enterócitos foi observada em todas as amostras, durante todo período avaliado. Todos os parasitas observados no interior da mucosa apresentaram estruturas preservadas como núcleo e principalmente a região do complexo apical, com suas estruturas características. Podemos observar na Figura 3, que após 30 minutos do inóculo dos taquizoítos irradiados, estes já se apresentavam no interior do epitélio intestinal.

No período de 4 horas e 30 minutos, notamos também o parasita muito bem conservado no interior da mucosa intestinal e a formação de uma estrutura característica ao redor do parasita, o vacúolo parasitóforo, como pode ser observado na Figura 4.

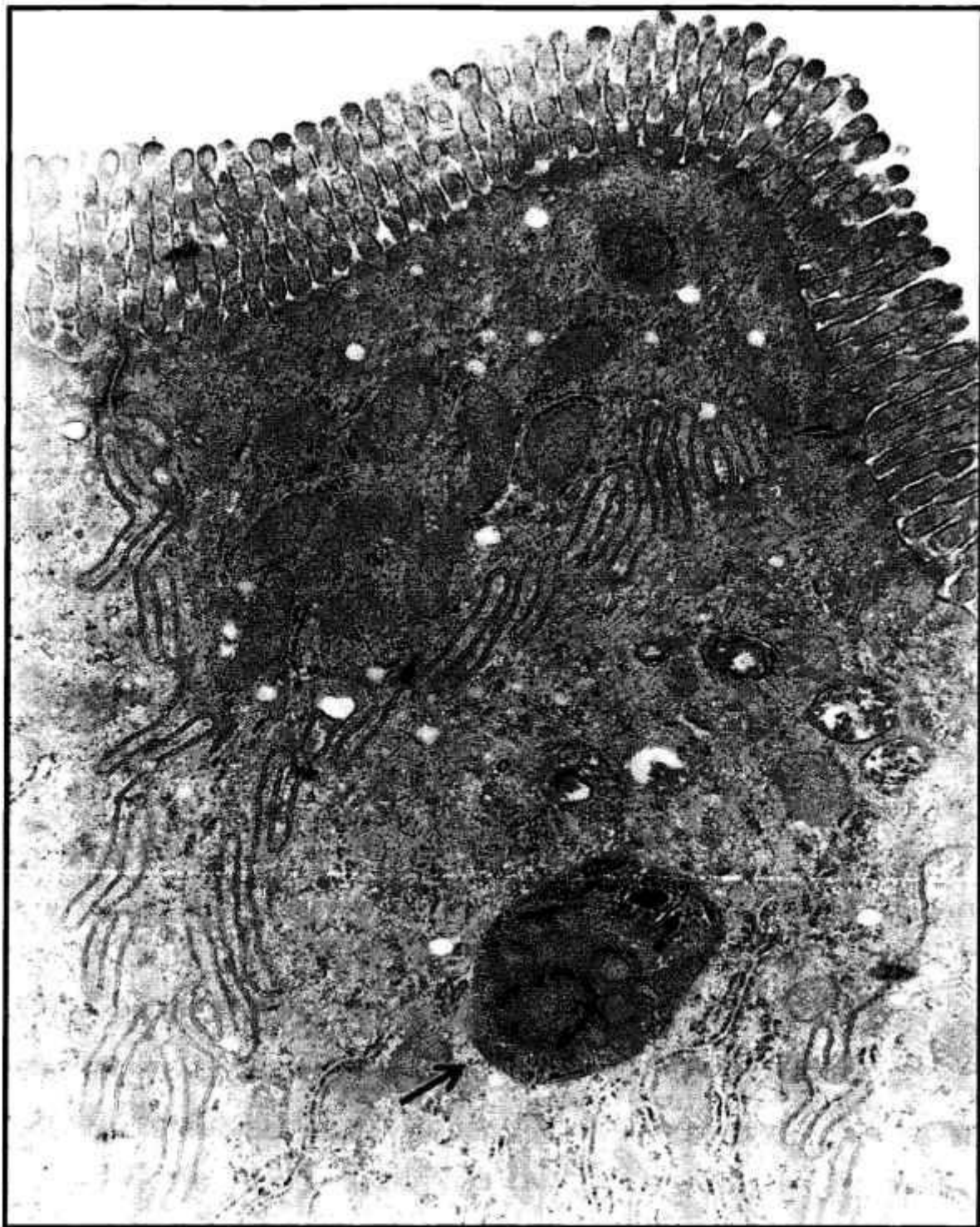


Figura 3 – Micrografia eletrônica da porção inicial do intestino delgado de camundongo C57BL/6j. A seta mostra um taquizoíto de *T. gondii*, no interior da mucosa intestinal, após 30 minutos do inóculo oral de parasitas irradiados a 255 Gy com hidróxido de alumínio. (30000X).



Figura 4 – Micrografia eletrônica da porção inicial do intestino delgado de camundongo C57BL/6j. A seta mostra um taquizoíto de *T. gondii*, no interior da mucosa intestinal, após 4 horas e 30 minutos do inóculo oral de parasitas irradiados a 255 Gy com hidróxido de alumínio. (50000X).

4.2 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy

Grupos de 5 animais (C57Bl/6j e BALB/c), foram imunizados com 10^7 taquizoítos irradiados por via i.p (sem veículo) e v.o (com hidróxido de alumínio), em intervalos quinzenais. O sangue caudal foi utilizado para a determinação das classes de anticorpos IgG, IgA e IgM por ELISA.

O ELISA para os camundongos C57BL/6j, mostrou que a produção de IgG sérico foi maior nos animais imunizados por via parenteral. Quando avaliamos a resposta de IgA sérica no mesmo grupo, notamos que apesar de menos intensa em relação a resposta de IgG, o perfil de resposta foi semelhante em ambas as vias de imunização. Após as três doses, o grupo imunizado por via parenteral também apresentou a maior produção da resposta para IgM, sendo insignificante a produção dessa imunoglobulina nos animais imunizados por via oral (Figura 5).

Nos camundongos BALB/c, inoculados via oral e via parenteral, podemos notar que, quando avaliamos a resposta IgG no soro desses animais, observamos que novamente o grupo imunizado i.p apresentou os maiores níveis em relação aos animais imunizados por via oral. Na avaliação da produção de IgA foi possível notar que o grupo imunizado por via oral apresentou níveis bem mais intensos em relação a imunização parenteral. Na produção de IgM, houve uma resposta mais evidenciada nos animais que receberam o inóculo parenteral, apesar dos animais que receberam o inóculo por via oral apresentarem um pequeno aumento na produção dessa imunoglobulina (Figura 5). Toda a evolução da produção dessas imunoglobulinas pode ser observada no Anexo 1.

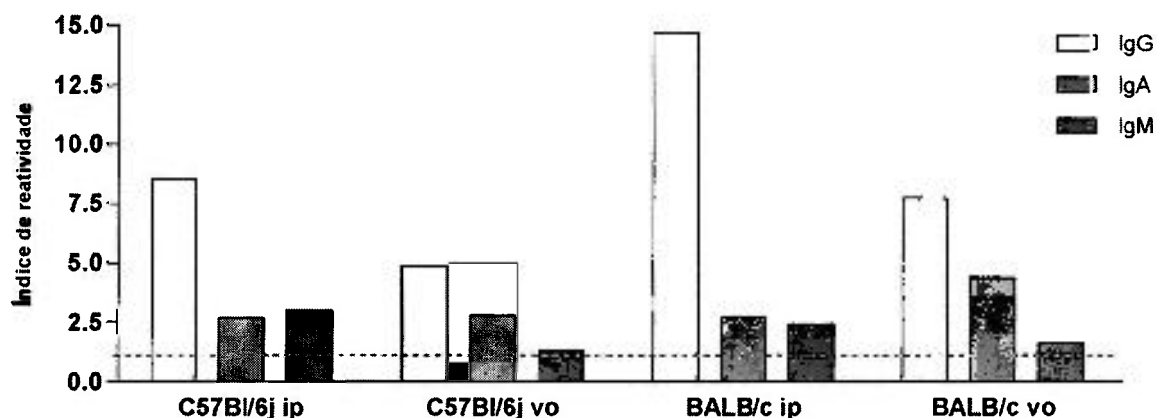


Figura 5 – Comparação da produção de anticorpos, no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoitos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.3 Determinação das subclasses de imunoglobulina G

Através do ELISA específico de subclasses, foi possível determinar a proporção das diferentes subclasses de IgG produzida nos soros dos camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com taquizoitos irradiados, por via oral ou parenteral.

Nos grupos dos animais C57Bl/6j, foi possível notar a maior produção dos níveis da subclasse IgG2b, porém o grupo imunizado via oral apresentou níveis menores quando comparados com o grupo intraperitoneal. Nos grupos dos camundongos BALB/c, observamos um aumento na produção das subclasses IgG1 e IgG2b em ambas as vias de inoculação, mas também com diferença entre os grupos que receberam inóculo oral e intraperitoneal (Figura 6).

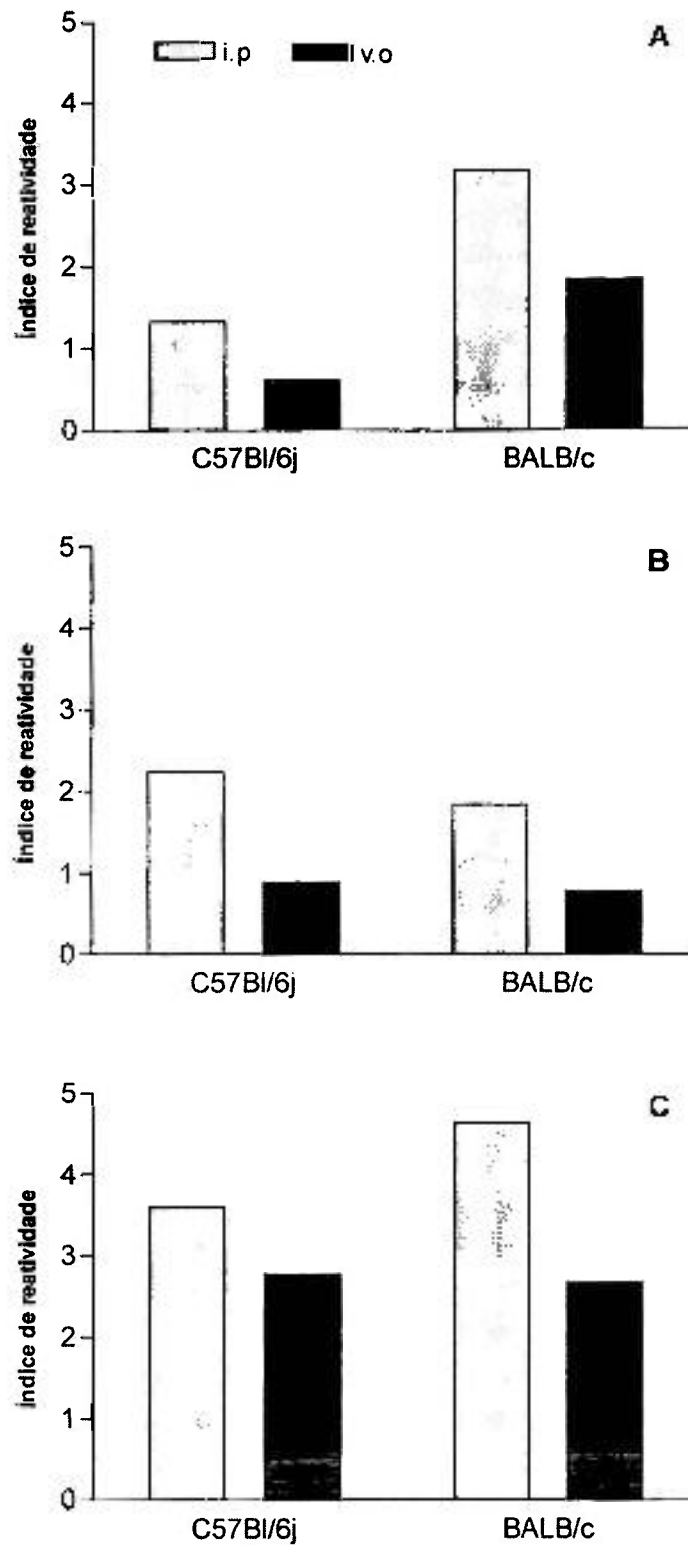


Figura 6 – Determinação das subclasses de IgG, IgG1(A), IgG2a(B) e IgG2b(C), produzidas no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com parasitas irradiados *T. gondii* (3 doses), por diferentes vias.

4.4 Avidéz no soro após imunização

Os resultados do ELISA para determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soro dos animais imunizados com parasitas irradiados, por via oral ou parenteral, estão demonstrados na Figura 7. Podemos notar que todos os grupos imunizados apresentaram níveis de avidéz semelhantes ou superiores aos animais infectados agudamente com cistos de ME49. Os grupos imunizados por via parenteral apresentaram maiores índices de avidéz quando comparados com o grupo que recebeu o inóculo por via oral, porém vale ressaltar que os animais C57Bl/6j apresentaram uma maturação da resposta mais rápida em relação aos grupos de animais BALB/c.

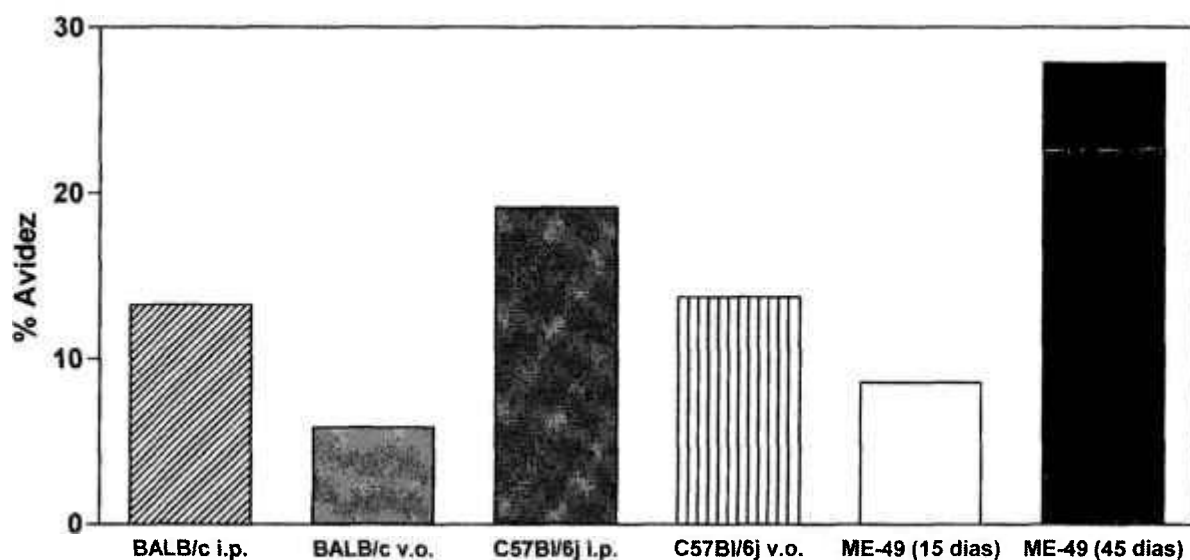


Figura 7 – Avidéz sérica dos camundongos C57Bl/6j e BALB/c, após imunização por via oral ou via intraperitoneal, com parasitas irradiados de *T. gondii*.

4.5 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com parasitas irradiados a 255 Gy

Para o estudo da produção de anticorpos pela mucosa intestinal dos animais imunizados (C57Bl/6j e BALB/c), foi realizado ELISA das fezes dos camundongos imunizados com 10^7 parasitas por via oral ou parenteral. Como podemos notar os animais C57Bl/6j, imunizados por via parenteral, não apresentaram excreção significativa de IgG e S-IgA, sendo detectado apenas um pequeno aumento de S-IgM. Nos animais C57Bl/6j, imunizados por via oral, notamos uma excreção mais intensa com relação à imunização parenteral, com uma excreção mais intensa de IgG e S-IgA (Figura 8).

Quando avaliamos a produção dessas imunoglobulinas em animais BALB/c, podemos notar que em ambas as vias de inoculação, ocorreu um aumento na excreção de todas as imunoglobulinas estudadas e superiores nos animais imunizados pela via parenteral. No entanto, os animais BALB/c imunizados por via oral apresentaram os maiores níveis de excreção de IgG e S-IgA. A evolução da excreção fecal dessas imunoglobulinas, nos modelos estudados, pode ser observada no Anexo 2.

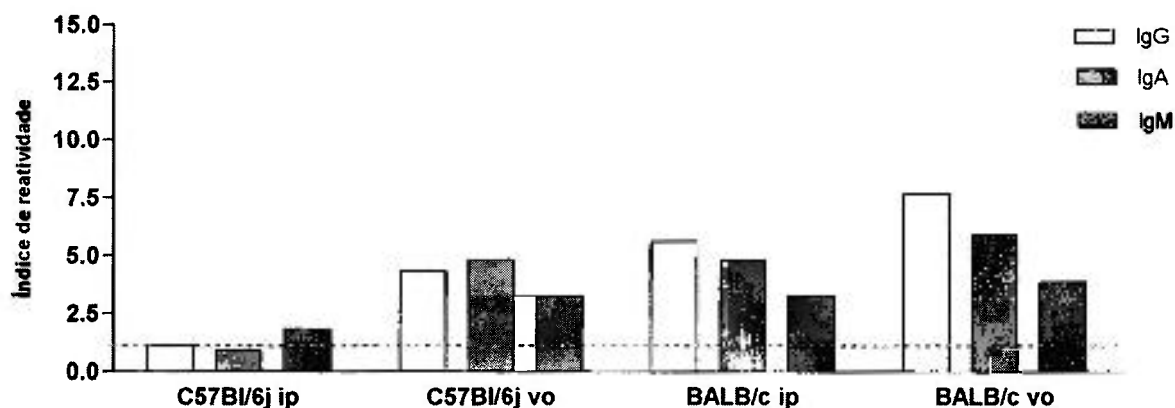


Figura 8 – Comparação da excreção de anticorpos, nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.6 Quantificações relativas por *real-time* PCR, das citocinas (INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10), em esplenócitos e células intestinais, de camundongos imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados

Para a detecção da expressão de citocinas nas células esplênicas e intestinais dos camundongos imunizados, foi realizado o *real-time* PCR para a detecção das citocinas INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10. Todos os valores foram obtidos em curvas de determinação da qualidade de cópias (Ct) e em seguida foi calculada a variação da expressão gênica através da comparação com a expressão de β -actina.

Como podemos observar, todos os grupos imunizados apresentaram expressão muito significativa de INF- γ , por estímulo do antígeno de *T. gondii* por células esplênicas, expressão esta menos intensa apenas no grupo C57Bl/6j imunizado por via oral. Nos grupos imunizados por via intraperitoneal, observamos

um aumento da expressão de IL-4 e IL-10, sendo mais evidenciada no grupo BALB/c, via oral, a produção de IL-4 em relação aos demais grupos. Os grupos imunizados por via oral apresentaram níveis de expressão de IL-4 e IL-10, inferiores ao encontrado no grupo controle infectado com ME49 (Figura 9).

Quando avaliamos a expressão dessas citocinas pelas células intestinais (placas de Peyer), podemos notar que a maior produção de IFN- γ e IL-2 por estímulo do antígeno foi encontrada nos grupos imunizados por via oral (Figuras 10B e 10D), apesar do grupo C57Bl/6j apresentar também um pequeno aumento na expressão de IL-4 em relação ao grupo BALB/c. Neste mesmo material, mas em grupos imunizados por via parenteral, os camundongos C57Bl/6j apresentaram um maior aumento na expressão de IL-4 em relação as outras citocinas (Figura 10A), já no grupo BALB/c a maior expressão foi de IL-10, com uma acentuada diminuição de IFN- γ (Figura 10B). O grupo infectado cronicamente com ME49 apresentou baixa produção em todas as citocinas estudadas, sendo um pouco mais significativa a expressão de IFN- γ (Figura 10E), menos que nos animais imunizados.

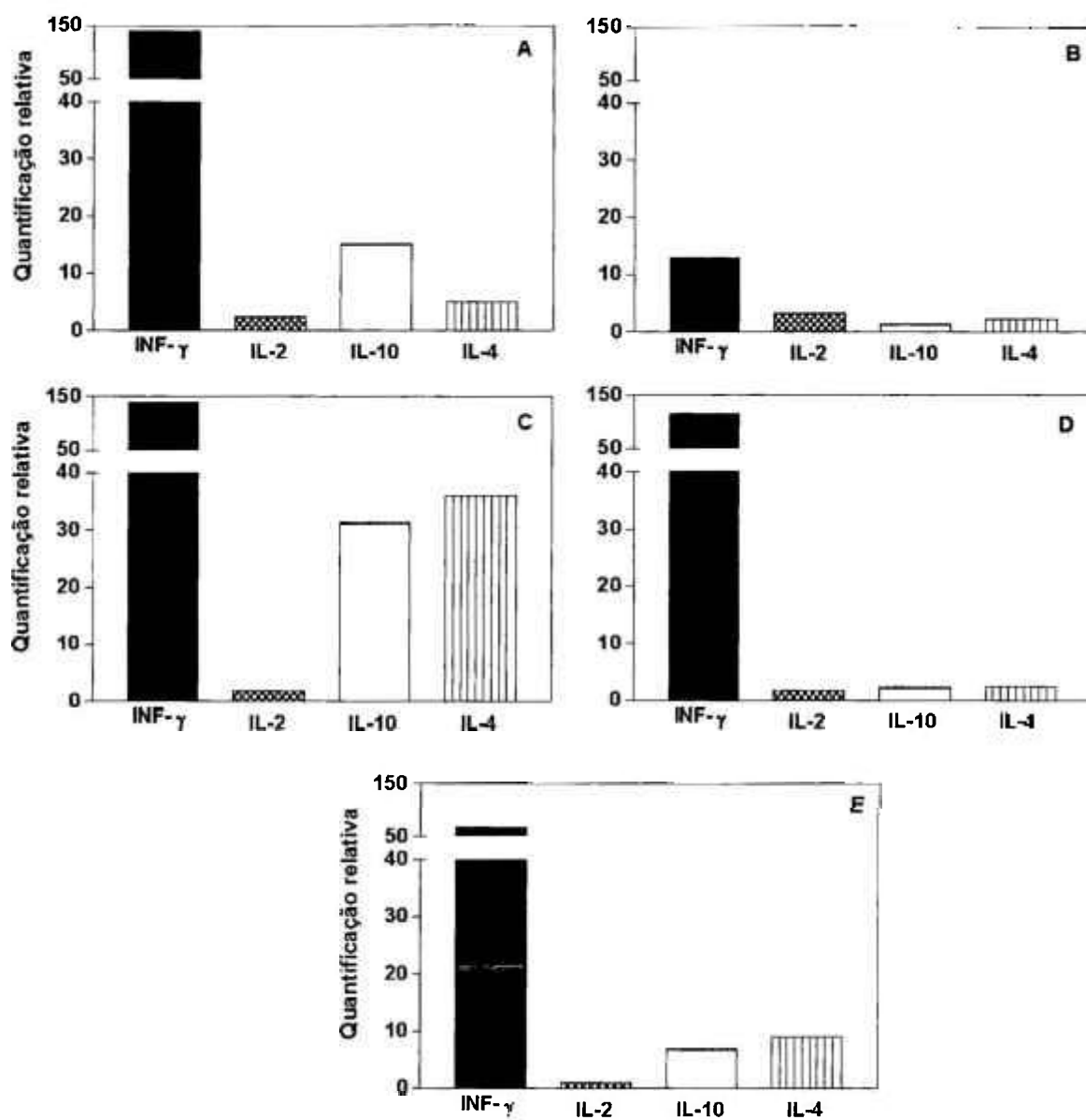


Figura 9 – Quantificação relativa da expressão de citocinas por esplenócitos de camundongos imunizados com taquizoitos irradiados de *T. gondii*, após 48 horas de estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii*. (A) C57Bl/6j i.p., (B) C57Bl/6j v.o., (C) BALB/c i.p., (D) BALB/c v.o. e (E) camundongo cronicamente infectado com ME49.

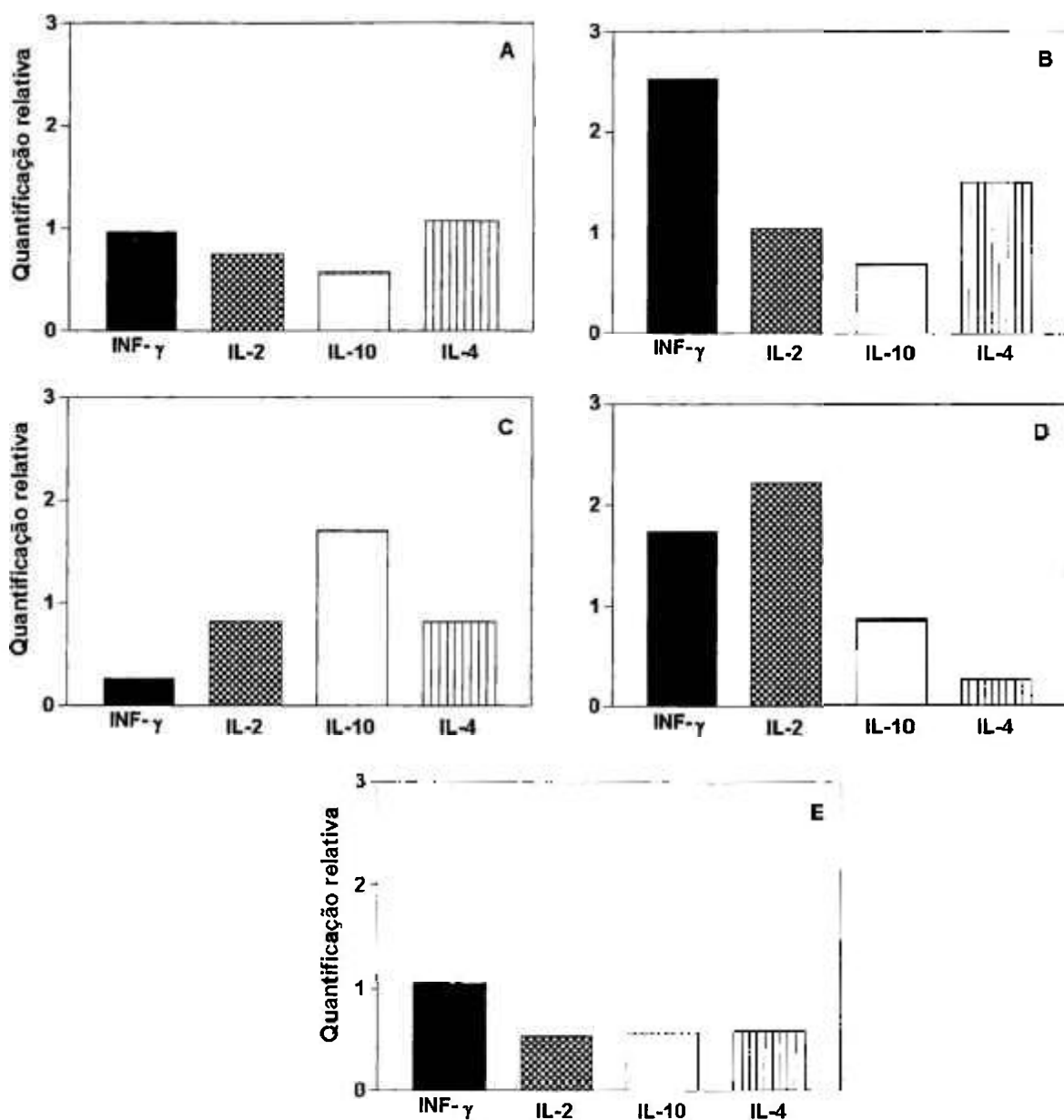


Figura 10 – Quantificação relativa da expressão de citocinas em células intestinais (placas de Peyer) de camundongos imunizados com taquizóitos irradiados de *T. gondii*, após 48 horas de estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii*. (A) C57Bl/6j i.p, (B) C57Bl/6j v.o, (C) BALB/c i.p, (D) BALB/c v.o e (E) camundongo cronicamente infectado com ME49.

4.7 Desafio com cistos da cepa ME49 nos animais imunizados com taquizoítos irradiados

Os diferentes níveis de proteção entre as diferentes linhagens de camundongos, imunizados com taquizoítos irradiados a 255 Gy e inoculados por via oral e por via parenteral foram determinados pela contagem de cistos cerebrais em animais sobreviventes.

Nos grupos controles após 15 dias do último inóculo, os animais (n=10) receberam cistos de ME49, por via oral. Não foi observada nenhuma morte em nenhum grupo imunizado, apenas 2 mortes no grupo C57BL/6j (não imunizado) na primeira semana do desafio, porém todos os demais animais apresentavam sinais clínicos de infecção com maior atividade no micro-isolador e eriçamento de pêlos.

Em ambos os grupos imunizados, foi possível notar eficientes níveis de proteção quando comparados com o grupo controle ($P<0.05$), além de níveis semelhantes de proteção entre eles, como pode ser observado na Figura 16. Os camundongos BALB/c apresentaram os maiores níveis de proteção. Apesar do grupo BALB/c controle apresentar uma quantidade de cistos menor quando comparado com o grupo controle dos camundongos C57BL/6j, o nível de proteção chegou a mais de 90%, sendo observados raros cistos em alguns animais de cada grupo imunizado, como mostra a Figura 11.

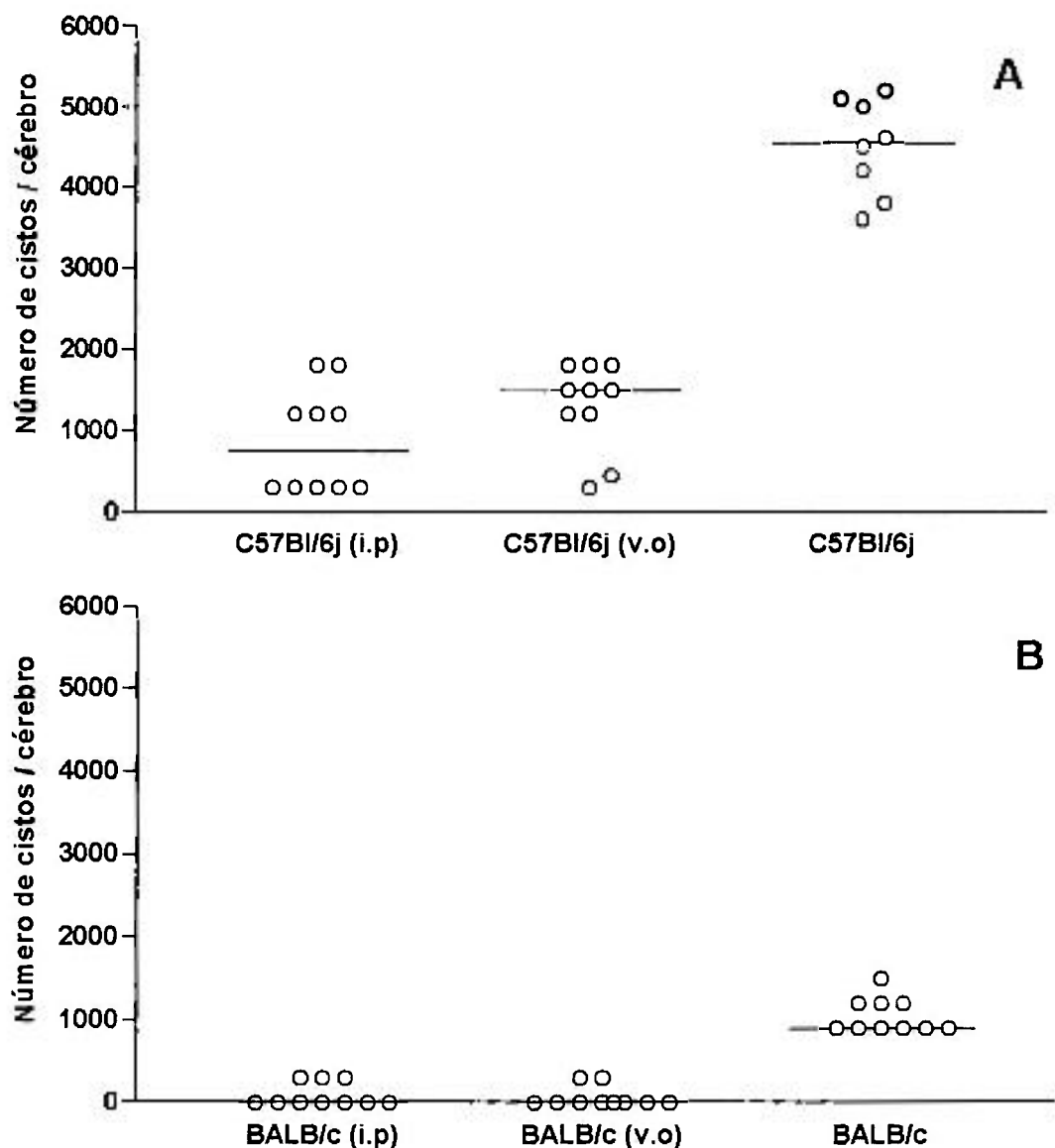


Figura 11 – Número de cistos cerebrais, identificados por microscopia de contraste de fase, após 30 dias do desafio oral com 10 cistos de ME49, em camundongos (A) C57Bl/6j e (B) BALB/c, imunizados via oral e via intraperitoneal, com parasitas irradiados de *T. gondii*.

4.8 Imunização e desafio dos animais geneticamente deficientes de IFN- γ

Como forma de avaliarmos o processo de imunização e a segurança das preparações vacinais, realizamos a imunização por via oral e intraperitoneal em camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ (n=10), com parasitas irradiados de *T. gondii*. Não foi

observada nenhuma morte durante os 45 dias de imunização dos animais, bem como, nenhuma outra alteração comportamental em nenhum dos grupos, independentemente das vias empregadas.

Após o período de imunização dos animais, todos os grupos receberam 10 cistos de ME49 (via oral). Notamos que entre o período do 10º ao 12º dia ocorreu a morte de todos os animais $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ do grupo controle. Os demais grupos imunizados também apresentaram algumas mortes entre o período do 10º ao 15º dia, mas em ambos os grupos 20% dos animais sobreviveram até o final do experimento (30 dias), como podemos observar na Figura 12. Todos os grupos, imunizados e posteriormente desafiados, apresentaram significância ($P < 0.05$) em relação aos grupos controles.

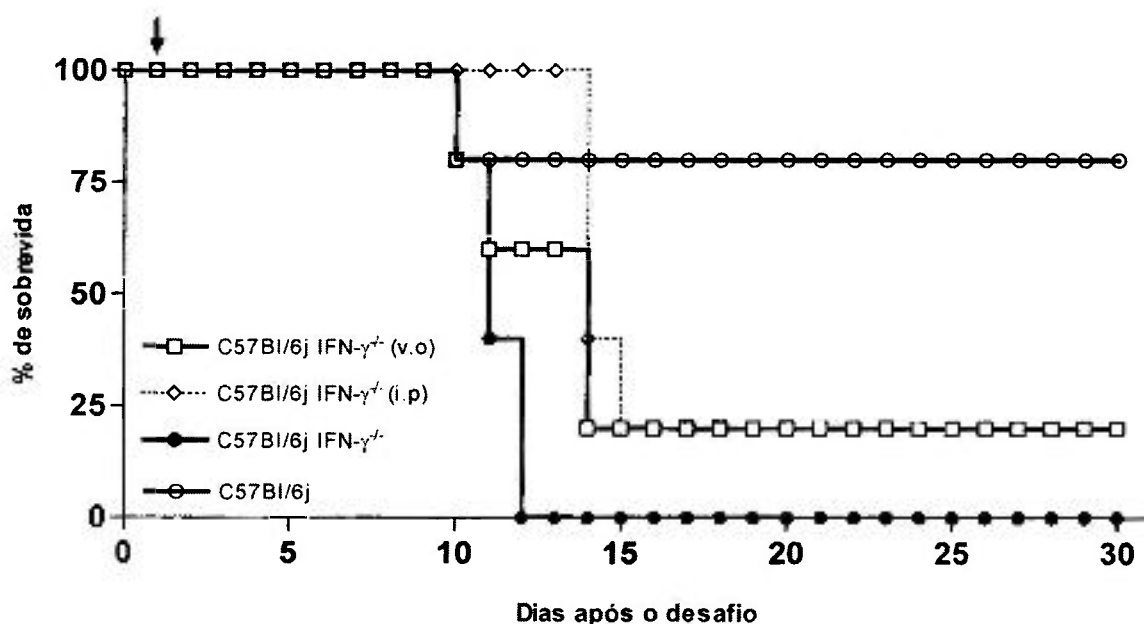


Figura 12 – Sobrevida dos camundongos C57Bl/6j $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$, imunizados por via oral ou intraperitoneal, com parasitas irradiados de *T. gondii* (3 doses) e desafiados com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME49.

4.9 Determinação dos anticorpos IgG, IgA e IgM, no soro de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados com parasitas irradiados a 255 Gy.

Grupos de 10 animais (C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$) foram imunizados com 10^7 taquizoítos irradiados por via parenteral (sem veículo) e por via oral (com hidróxido de alumínio), em intervalos quinzenais. O sangue caudal foi utilizado para a determinação dos níveis de IgG, IgA e IgM por ELISA.

Como podemos notar na Figura 13, os animais C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados por via parenteral, apresentaram maiores níveis de IgG em comparação com os animais imunizados por via oral. Esses níveis foram semelhantes ao grupo de animais não deficientes e imunizados pela mesma via e foram superiores aos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados por via oral. Quando avaliamos a produção de IgA no soros dos animais, observamos uma produção significativa em todos os grupos analisados, com uma menor produção pelos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados por via oral. Na avaliação da produção de IgM no soro dos grupos imunizados, notamos uma produção significativa apenas nos animais imunizados por via parenteral, com uma produção mais acentuada nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ (Figura 13). Toda a evolução da produção dessas imunoglobulinas pode ser observada no Anexo 3.

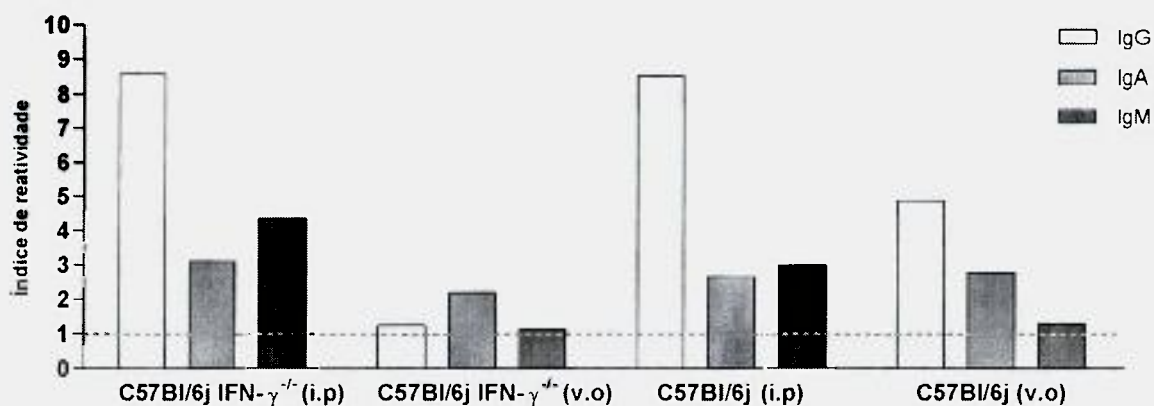


Figura 13 – Comparação da produção de anticorpos, no soro de camundongos C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ e C57Bl/6j, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.10 Determinação dos anticorpos IgG, S-IgA e S-IgM, nas fezes de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, imunizados com parasitas irradiados a 255 Gy

Para avaliarmos a produção de imunoglobulinas excretadas nas fezes dos animais C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii*, realizamos ELISA nas amostras de suspensões fecais dos grupos.

Na avaliação da excreção de IgG nas fezes, notamos que todos os grupos apresentaram excreção dessa imunoglobulina, sendo menos evidenciada no grupo C57BL/6j imunizado por via parenteral e mais evidenciada no mesmo grupo imunizado por via oral. A produção de S-IgA e S-IgM apresentaram um aumento substancial de excreção nos animais deficientes de IFN- γ , após as imunizações (Figura 14). Toda a evolução, por todo o período da imunização, da excreção dessas imunoglobulinas pode ser observada no Anexo 4.

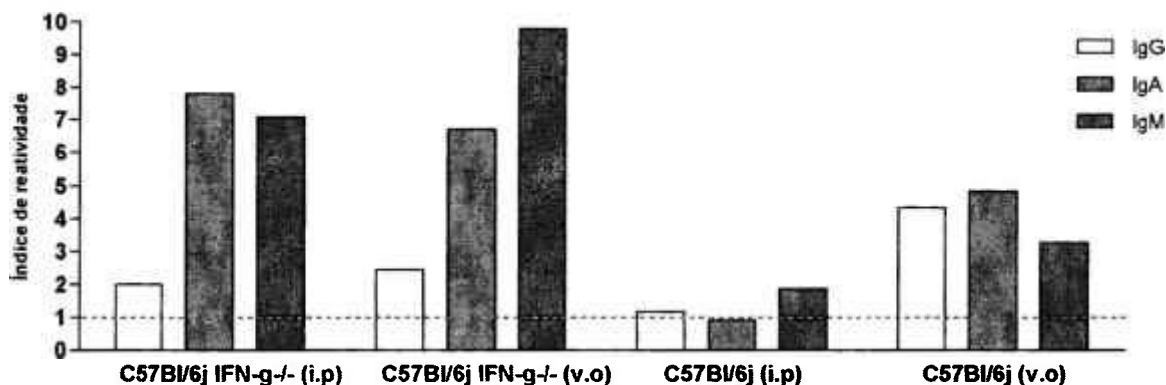


Figura 14 – Comparação da excreção de anticorpos, nas fezes de camundongos C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ e C57Bl/6j, detectados após 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, imunizados por v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. Linha pontilhada representa a produção basal das imunoglobulinas.

4.11 Desafio com cistos da cepa ME49 dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados com taquizoítos irradiados

Após o período de imunização, os animais foram submetidos ao desafio oral com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME49. Podemos observar que em ambos os grupos houve um aumento na sobrevivência dos animais, sendo levemente maior nos animais imunizados pela via parenteral. Após o 15º dia do desafio, 20% dos animais não apresentavam nenhum sinal da doença e permaneceram vivos até o 30º dia após o desafio, onde foram sacrificados e o número de cistos em seus cérebros determinados.

O grupo C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ que recebeu a imunização por via parenteral foi o grupo com a menor quantificação de cistos no cérebro, após o desafio ($P < 0.05$). Os animais que receberam o inóculo por via oral apresentaram uma quantidade maior de cistos cerebrais, semelhantes aos animais não imunizados e sem deficiência de IFN- γ , como podemos observar na Figura 15.

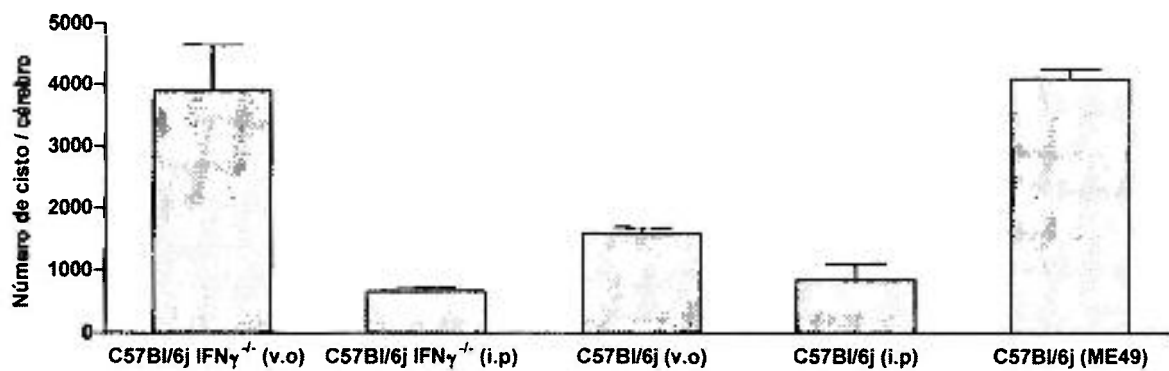


Figura 15 – Determinação, por microscopia de contraste de fase, da quantidade de cistos cerebrais em camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados e sobreviventes, após 30 dias do desafio com 10 cistos da cepa ME49.

V DISCUSSÃO

Como já havia sido comprovado anteriormente pelo nosso grupo, não houve alteração das características de biologia celular do *T. gondii*, após o processo de radiação ionizante a 255 Gy, bem como houve preservação de sua capacidade de invasão “*in vivo*” das células intestinais. Esses achados confirmam os encontrados por HIRAMOTO e col. (2002), onde os parasitas apresentavam suas características de invasão “*in vitro*” preservadas, mesmo após irradiação a 255 Gy, em células LLC-MK2 e fibroblasto humano. Nossos dados são importantes porque ainda não havia sido confirmada a manutenção dessas características, durante o processo natural de invasão “*in vivo*”.

Há poucos estudos de imunidade utilizando parasitas de *T. gondii* por via oral, porém algumas tentativas utilizando oocistos irradiados, na dose igual ou superior a 0,25 KGy, quando inoculados por via oral, apresentavam proteção contra a formação de cistos nos cérebros de camundongos desafiados com oocistos viáveis (DUBEY *et al.*, 1996b). Tentativas de imunizações orais, utilizando antígenos isolados de *T. gondii*, já foram realizadas no passado por nosso grupo, porém não foi possível obter uma produção de anticorpos satisfatória, ou proteção contra a formação de cistos (dados não mostrados). Contudo, outros grupos utilizando imunizações com antígenos de *T. gondii* em associação com toxina colérica, induziram uma melhor qualidade da resposta imune sistêmica e de mucosa, mas sem proteção quando foram desafiados com cistos da cepa 76K, apresentando baixos níveis de proteção (BOURGUIN *et al.*, 1993).

Em estudos anteriores, realizados por nós, com taquizoítos irradiados e administrados por via oral, foi possível observar uma intensa resposta sérica e

intestinal contra o *T. gondii*, com proteção parcial da formação de cistos em camundongos C57Bl/6j (GALISTEO Jr *et al.*, 2005), no entanto, essa resposta poderia ser desencadeada por restos imunogênicos dos taquizoítos digeridos pelo estômago dos camundongos.

Pela observação por microscopia eletrônica, podemos notar a qualidade da proteção dos parasitas pelo hidróxido de alumínio, demonstrando que o uso desse veículo não interfere na penetração das células pelos parasitas e ainda mantém todas as condições para que os taquizoítos ultrapassem as barreiras do trato digestivo, da forma mais íntegra possível. Essa abordagem é muito importante, porque para o sucesso da imunização oral, é necessária uma efetiva apresentação dos antígenos nos sítios de indução imune na mucosa intestinal, como nas placas de Peyer e epitélio intestinal (CRIPPS *et al.*, 2001). A integridade do parasita e sua capacidade de penetração em células intestinais são essenciais para a produção de uma resposta imune protetora adequada, sendo esta abordagem, a mais próxima do que ocorre na natureza (HIRAMOTO *et al.*, 2002).

Todas as linhagens de camundongos imunizados apresentaram níveis detectáveis e um aumento progressivo na produção de IgG sérica. Os níveis de IgG detectados nos soros das diferentes linhagens de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados a 255 Gy, foram menores nos animais imunizados via oral. Esses resultados foram observados anteriormente em camundongos C57Bl/6j, quando imunizados com taquizoítos irradiados e utilizada como via a inoculação oral (GALISTEO Jr *et al.*, 2005). Vale notar que a exposição dos antígenos no trato gastrointestinal é capaz de induzir uma resposta humoral sistêmica, porém com menor intensidade do que quando a exposição é feita por via parenteral (OGRA & METECKY, 1994). Este fato foi muito bem observado quando analisamos os níveis

de IgG produzidos em nossos modelos. Perfil semelhante de resposta foi observado em outros modelos utilizando partículas de lipossomos contendo antígenos de *Escherichia coli*, e quando administrado por via oral, apresentou níveis de IgG elevados no soro, e conseqüente diminuição da infecção por *E. coli* (Tana *et al.*, 2003).

O mesmo padrão de resposta foi observado quando avaliamos a produção de IgA no soro das linhagens estudadas. Apenas nos animais da linhagem BALB/c, imunizados por via oral, foram observados os maiores níveis, desde o primeiro inóculo. Sabe-se que a IgA sérica tem um importante papel em bacteremias, evitando a septicemia e a doença (VAN EGMOND *et al.*, 2001), é a segunda mais abundante imunoglobulina produzida no soro, com cerca de 20% do total e apresenta atividade pró-inflamatória (VAN EGMOND, *et al.*, 2001). Atualmente a vacina comercial para *Giardia* (GiardiaVax[®], Fort Dodge Animal Health), desenvolvida com antígenos de trofozoítos, demonstrou uma alta imunidade protetora em cães. Esse fato está relacionado principalmente pelos altos níveis de IgG e IgA presentes no soro e na mucosa dos animais vacinados, demonstrando mais uma vez a importância dessa imunoglobulina na proteção sistêmica contra parasitas (OLSON *et al.*, 1997; OLSON *et al.*, 1996). Estudos recentes de imunização com proteína recombinante rCWP2 de *Giardia duodenalis*, mostraram que altos níveis de IgA sérica, também foram muito importantes na inibição da liberação de cistos, diminuindo assim a transmissão da doença (LAROCQUE *et al.*, 2003). Esses e nossos dados sugerem que a IgA sérica tem uma importante função como uma das linhas de defesa sistêmicas do organismo contra o *T. gondii*, como já descrito pela inibição na invasão de enterócitos, pela S-IgA (MACK & McLEOD, 1992).

Quando avaliamos a produção de IgM sérico nessas amostras, notamos que apenas houve uma produção mais significativa nos animais imunizados por via intraperitoneal, demonstrando mais uma vez a diferença de resposta quando utilizamos vias de imunizações diferentes. Dados já comprovaram que altos níveis de IgA e IgM no soro de ratos, auxiliam na resistência a infecções por *T. gondii*, demonstrando dessa forma a importância dessas imunoglobulinas no combate a infecção (GODARD *et al.*, 1990). Outros autores demonstraram que bons níveis de IgM tem um importante papel no controle da disseminação sistêmica de taquizoítos, durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* (COUPER *et al.*, 2005). Em nossos ensaios houve uma queda após a terceira dose, este fato pode estar relacionado com a sustentação dos níveis maiores de IgG e IgA, o que pode ocorrer através do processo de *switching* de classes, onde no decorrer da maturação da resposta imunológica, por rearranjos gênicos, as células B passam a produzir anticorpos mais específicos e com maior afinidade como IgA e IgG (CERUTTI, A., 2008).

O resultado das subclasses de IgG mostraram padrões semelhantes entre os grupos, porém os animais imunizados via parenteral apresentaram os maiores níveis em todos os tipos de subclasses. Quando analisamos a rota oral de imunização, notamos que a produção de subclasses de IgG, apesar de presente, apresentou níveis mais baixos, mas a diferença está apenas na intensidade e não na proporção das subclasses. Este fator está relacionado com a via de estimulação onde imunizações sistêmicas refletem um maior sinal sérico quando comparado com uma estimulação na mucosa intestinal. Outro fato observado é a baixa produção de IgG2a pelos animais C57Bl/6j, isso segue características próprias desta linhagem que apresenta deficiência no gene que controla a produção dessa subclasse (MARTIN & LEW, 1998; MORGADO *et al.*, 1989), porém, podemos perceber

claramente que a resposta tipo Th1 é mais intensa nos animais C57BL/6j, ao passo que nos animais BALB/c a resposta tende para um balanço entre Th1/Th2. Caracteristicamente os animais C57BL/6j apresentam uma resposta tipo Th1 e os animais BALB/c apresentam uma resposta basal voltada para o tipo Th2 (PINCHUK *et al.*, 2008), com isso podemos notar que após o processo de imunização, os animais do tipo BALB/c, adquirem um perfil voltado preferencialmente para uma resposta Th1, mas ainda mantendo níveis aumentados de IgG1. Este tipo de perfil também foi encontrado em estudos de imunização utilizando vacina de DNA (AMA1) onde os camundongos apresentaram, após imunização, um balanço na resposta Th1/Th2, sendo encontrado em animais BALB/c, os melhores índices de proteção na fase aguda (DAUTU *et al.*, 2007).

Avaliando a maturação dos anticorpos IgG no soros dos animais imunizados, notamos que em todos os grupos, os anticorpos encontrados foram de baixa avidéz, porém os níveis foram iguais ou superiores aos animais infectados agudamente com cistos de ME49. Este fato deve estar relacionado ao tempo da maturação da resposta imune em camundongos. Nosso ensaio foi realizado após 6 semanas, o que deve ter dificultado a obtenção de maiores índices de avidéz, já que em outros modelos, utilizando a maturação de vírus, os índices de avidéz demoram meses para atingir níveis como os da infecção natural (SOUZA *et al.*, 1997). Alguns autores descrevem índices de avidéz iguais ou superiores a 40%, por volta da décima semana do início da imunização (CHEN *et al.*, 2003a). As reações de avidéz apresentaram difícil padronização dada a qualidade de antígeno e o tipo e concentração do caotrópico utilizado, dificultando comparações entre dados de autores diferentes (HEDMAN *et al.*, 1989) Podemos notar também que apesar da imunização oral apresentar menores níveis de IgG no soro, esses anticorpos

apresentaram índices de avidéz consideráveis quando comparamos com os níveis encontrados na fase aguda da doença. Isto pode ser explicado pelo tipo de imunização utilizado, já que em geral, os índices de avidéz são determinados em vacinas vivas atenuadas, que simulam os resultados de uma infecção natural e não para antígenos com apresentação cíclica, como os utilizados em nossos modelos.

Na infecção natural, *T. gondii* é normalmente adquirido por ingestão de cistos ou oocistos, proporcionando assim uma importante fonte de estímulo sistêmico e principalmente na mucosa, por esse motivo é muito importante saber o verdadeiro papel das imunoglobulinas no bloqueio inicial da infecção. No estudo das imunoglobulinas excretadas/secretadas, na mucosa intestinal, podemos observar que apenas o grupo C57Bl/6j (i.p) apresentou os menores níveis de produção dos três tipos de imunoglobulinas nas fezes, todos os demais grupos apresentaram altos níveis de produção, em especial as classes IgG e S-IgA.

Níveis significativos de IgG já haviam sido observados por outros autores em estudos utilizando imunizações orais com antígenos sonicados em associação com toxina colérica (BOURGUIN *et al.*, 1991) e essa imunoglobulina, em conjunto com S-IgA, produzidas em intestinos de gatos infectados, atuaram na diminuição da penetração de *T. gondii* em fibroblastos, demonstrando a importância da IgG fecal na prevenção da infecção (OMATA *et al.*, 1997). Como já havia sido comprovado os anticorpos IgA anti-*T. gondii* secretados no leite demonstraram ser muito eficientes na proteção contra a toxoplasmose quando o desafio ocorre de forma natural, por via oral (McLEOD & MACK, 1986). Os mesmos autores também conseguiram comprovar que a S-IgA, diminui a infecção de enterócitos em 75% “*in vitro*” (MACK & McLEOD, 1992), demonstrando mais uma vez a importância dessa imunoglobulina no bloqueio da invasão do *T. gondii*, nas células intestinais. Os níveis de S-IgM são

substancialmente menores que a S-IgA, pela dificuldade de transporte da IgM, essa imunoglobulina apresenta normalmente uma produção menor nas mucosas de maneira geral. Além disso, a S-IgM não pode substituir totalmente S-IgA em termos funcionais, devido à sua maior sensibilidade às enzimas proteolíticas, e sua capacidade de ativar, em nível tecidual, a cascata de complemento com potenciais danos colaterais. Interessante notar que em pacientes deficientes em IgA, a IgM pode substituir aquela imunoglobulina em suas funções secretoras na mucosa (NORHAGEN, et al., 1989) Apesar da baixa afinidade, anticorpos de mucosa do isotipo IgA e IgM exibem alta avidéz devido a vários sítios de ligações com antígenos (quatro para dímeros de IgA e 10 para pentâmeros de IgM) resultando no reforço da sua capacidade de interagir com antígenos inertes e para neutralizar biologicamente antígenos ativos, sendo desta forma duas imunoglobulinas importantes na proteção local contra patógenos (WOOF & MESTECKY, 2005).

Para o estudo da expressão gênica de citocinas esplênicas dos animais imunizados, realizamos a avaliação através do real-time PCR. Podemos notar uma diferença na expressão de citocinas entre os grupos, com um aumento significativo de IFN- γ e IL-10 nos grupos imunizados por via intraperitoneal. IL-10 já demonstrou ter um papel importante no controle da morte de animais infectados com *T. gondii* ou *T. cruzi*, onde nesses modelos, apesar do controle da infecção, a morte é causada pelo aumento descontrolado na produção de citocinas pró-inflamatórias. Em células animais, células efectoras Th1 produzem IL-10 como meio de prevenção de danos colaterais, como um mecanismo de autocontrole, porém esse mecanismo também pode ser utilizado como escape por agentes patogênicos (TRINCHIERI, 2007). Embora em células humanas a polarização extrema da resposta tipo Th1, junto da presença de altos níveis de IL-12, induzirem o aumento dos níveis de IL-10 e IFN- γ

(GEROSA *et al.*, 1996), em animais a IL-12 não apresenta esse papel em células Th1 de camundongos infectados por *T. gondii*, onde o próprio parasita durante a infecção, controla a expressão de IL-10 (TRINCHIERI, 2007). Apesar do aumento de IFN- γ nos animais imunizados por via oral, não foi possível observar o mesmo efeito de aumento da IL-10 em células esplênicas.

A expressão dessas citocinas na mucosa intestinal apresentou um comportamento distinto do apresentado pelas células esplênicas. Na estimulação das placas de Peyer, podemos notar que não houve uma produção tão intensa de IFN- γ . Isto pode ser devido a diferentes populações celulares encontradas nestas placas, quando comparadas ao baço. As populações celulares intestinais estão em parte envolvidas com a tolerância aos antígenos, quer seja por alteração na apresentação de antígeno por células dendríticas profissionais (FARIA & WEINER, 2005) quer pela presença maior de subpopulações linfocíticas com receptores tipo $\gamma\sigma$, envolvidos em mecanismos de tolerância imunológica (MOWAT, 2003). A maior produção local de IL-10 em animais imunizados lembra este mecanismo de controle da imunidade, já que esta seria uma das principais citocinas envolvidas na indução de tolerância (MOWAT, 2003), mas é interessante notar que a produção foi mais intensa nos modelos de imunização parenteral. Nas células linfóides intestinais estimuladas a produção de IFN- γ foi muito menos marcante que nas células esplênicas, sugerindo que a população que foi estimulada não pertencia ao grupo CD8 de citotoxicidade clássica (DEROUIN, 1992), talvez envolvida com a produção local de plasmócitos e resposta do tipo Th2, evidenciada pela maior produção de anticorpos IgA e IgM para excreção nas fezes.

Analisando as respostas em conjunto, podemos sugerir que uma imunização parenteral resulta numa resposta imune voltada para proteger o hospedeiro contra

agressores que já invadiram o sistema, pela produção de células CD8 e produção maciça de IFN- γ ativador de macrófagos. Já a resposta imune induzida pela imunização oral também induz esta resposta em baço, embora de menor intensidade, mas também induz uma imunidade intestinal voltada para a produção de citocinas de proliferação como a IL-2, que indica a produção de células para a resposta efetora como linfócitos B para produção de anticorpos ou células CD8 $\alpha\alpha$ especializadas na migração luminal e combate externo ao agente. Estas células CD8 $\alpha\alpha$ não estão relacionadas com produção de interferon na produção de imunidade efetora em infecções semelhantes (FRANCO *et al.*, 1997) e tem sido uma difícil tarefa elucidar sua função (JIANG *et al.*, 2008), embora seja a célula CD8 mais produzida do organismo e muito efetiva (ROCHA, 2007).

Quando submetemos os diferentes grupos de animais imunizados aos esquemas de desafio com a cepa ME49 de *T. gondii*, notamos que em todos os grupos houve uma proteção significativa em relação ao grupo controle. Em todos os esquemas vacinais, o nível de resposta foi muito próximo dos já encontrados anteriormente por nós, utilizando camundongos C57Bl/6j, tanto quando imunizados i.p ou via oral (HIRAMOTO *et al.*, 2002; GALISTEO Jr. *et al.*, 2005). Porém, os camundongos BALB/c foram os que apresentaram níveis mais elevados de proteção, com diminuição contra a formação de cistos, em cerca de 80% dos animais após o desafio com a cepa ME49, chegando a não detectarmos cistos por microscopia convencional, na maioria dos casos. Imunizações utilizando uma mistura de 3 adenovírus modificados, que expressam proteínas de superfície de *T. gondii* (SAGs), apresentaram uma redução de 80% da carga parasitária de cistos após o desafio com a cepa P-Br, porém não foi observado a ausência de cistos em nenhum dos animais avaliados (CAETANO *et al.*, 2006). Além dos animais BALB/c

apresentarem naturalmente uma resistência genética aos cistos de ME49 (SUZUKI *et al.*, 1995), provavelmente essa maior proteção esteja relacionada ao fato destes apresentarem uma resposta mais voltada para um balanço entre Th1/Th2, influenciada por uma maior produção de IL-10 (HSIEH *et al.*, 1995) e por apresentarem também uma maior produção de IgG e S-IgA nas fezes, promovendo assim condições mais favoráveis para uma melhor proteção da mucosa intestinal.

Animais com deficiência de IFN- γ foram submetidos à imunização com os parasitas irradiados, por via oral e intraperitoneal. Podemos observar que não houve nenhuma morte ou evidência da doença, em nenhum grupo, durante o processo de imunização. Animais com deficiência na produção de IFN- γ , não produzem uma resposta sistêmica completa e efetiva contra o *T. gondii*, fato que leva os mesmos a morte em no máximo 10 dias após serem infectados com cistos de ME49 (CARMO, 2006). Diversos autores demonstraram que apenas um parasita viável é capaz de instalar a infecção, levando os camundongos a morte após alguns dias. Em nossos achados, os animais IFN- $\gamma^{-/-}$ sobreviveram por 45 dias, durante todo período da imunização, sem qualquer comprometimento ou óbito de nenhum animal. Esses resultados demonstram que nosso preparado vacinal apresenta excelente nível de segurança, podendo ser utilizado como imunógeno em animais.

Após o período de imunização podemos notar uma produção efetiva de anticorpos no soro e nas fezes de todos os grupos estudados, mostrando que mesmo na ausência de IFN- γ , os animais conseguiram produzir uma resposta humoral contra nosso imunógeno. Fato semelhante foi observado em modelos utilizando imunizações com esporozoítos atenuados geneticamente de *P. berghei* em camundongos C67Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$, onde houve a produção de uma resposta específica de anticorpos (MUELLER *et al.*, 2007). Após o período de imunização, os

animais receberam o desafio oral com cistos da cepa ME49 e em ambos os grupos notamos um aumento na sobrevivência dos animais, chegando a uma proteção de 20% (n=4). Nesses animais sobreviventes, foi possível observar, a presença de cistos cerebrais, sendo em maior quantidade, nos animais imunizados por via oral. Nossos dados sugerem que em animais deficientes de IFN- γ , após imunização prévia, a proteção foi provavelmente sustentada por anticorpos específicos presentes no soro e nas fezes, no entanto sua eficiência parece ser limitada, pelo fato desses animais não ficarem protegidos contra a formação de cistos cerebrais.

Como já relatado por outros autores o IFN- γ tem um importante papel na proteção da infecção e controle da proliferação do *T. gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1994), mas outros fatores podem estar presentes, evidenciado na ausência dessa quimiocina. Alguns autores reportam que a resistência em camundongos deficientes de IFN- γ , seja dada através da via CD40-CD154, onde ocorre o favorecimento da ativação de células apresentadoras de antígeno e ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺, como um importante papel na resposta imunológica a patógenos intracelulares (SUBAUSTE & WESSENDARP, 2006). Nossos dados de anticorpos mostram que a produção de S-IgA e S-IgM foi maior nestes animais, o que corrobora esta afirmação, relacionada ao efeito de células T reguladoras, que dependem de IFN- γ para sua ação.

Interessante notar que, pelos resultados por nós obtidos, a resposta celular apresenta um papel muito importante no controle da infecção e na diminuição da formação de cistos, porém vale ressaltar a importância da resposta humoral, tanto sérica e principalmente a intestinal, no combate inicial do bloqueio da invasão do parasita no hospedeiro. Esses dados sugerem que esse tipo de abordagem favorece muito imunização de felinos, pois podemos iniciar o combate da infecção já no

momento da ingestão dos parasitas por esses animais, impedindo assim a aquisição da infecção e num segundo momento à eliminação de oocistos na natureza. Além do mais, combate preventivo contra o parasita, impedindo que ele através de mecanismos de escape se instale no hospedeiro, parece ser a forma de maior sucesso contra a instalação da infecção no hospedeiro até o momento.

O uso de parasitas viáveis, mas bloqueados em seu mecanismo de reprodução, favorece a apresentação correta dos antígenos e deixa a abordagem a mais próxima da forma natural da infecção, que induz proteção eficiente em imunocompetentes, pelo menos quanto ao desenvolvimento de doença (HIRAMOTO *et al.*, 2002, REMINGTON *et al.*, 2005). Outro fator adicional é o uso da radiação ionizante, que age diretamente nas proteínas, promovendo a oxidação e tornando-as mais facilmente captadas por macrófagos, através de receptores scavengers específicos, aumentando sua imunogenicidade (PINHO *et al.*, 1995; CARDI *et al.*, 1998).

Outro aspecto pouco levantado em anos recentes é a eficiência da radiação ionizante como ferramenta na produção de parasitas viáveis, mas sem capacidade de reprodução, em especial para parasitas mais complexos, com divisão sexuada, como protozoários do filo Apicomplexa (HIRAMOTO *et al.*, 2002; NUSSENZWEIG *et al.*, 1969) e helmintos (WALES & KUSEL, 1992), ideais para vacinas. Helmintos produzem uma imunidade concomitante, impedindo novas infestações após a instalação de um parasita em um hospedeiro. Esta imunidade é a ideal para prevenir novas infestações e tem sido proposta com sucesso em esquistossomose (McMANUS & LOUKAS, 2008). A ciência não deve esquecer os potenciais de processos preconceituosamente considerados como perigosos e o uso cada vez maior da radiação na esterilização de materiais para uso humano e alimentos mostra

este aspecto. A radiação é uma ferramenta poderosa e perigosa, mas temer não significa não estudar ou usar, se não ainda estaríamos sem utilizar o fogo, que queima. O estudo, e o uso criterioso, da radiação ionizante em agentes biológicos podem resultar em inúmeras formas de produção de insumos úteis para a humanidade. Cabe apenas a nós prover o conhecimento para este uso seguro da radiação e não compartilhar do temor visceral do desconhecido.

Quando pensamos em animais com carne de consumo humano, como suínos e ovinos, as formas de controle da infecção estão relacionadas com as boas práticas de manejo, como controle de roedores e felinos nas instalações, educação sanitária e vacinação. O desenvolvimento de uma vacina para imunização desses animais, principalmente de felinos domésticos e selvagens, é a estratégia de controle que tem como objetivo reduzir as perdas econômicas em animais de produção e o número de cistos teciduais na carne destes animais. Dessa forma, pode-se diminuir o risco de infecção ao homem pela ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida de animais infectados e ainda prevenindo a eliminação de oocistos pelos felídeos. Tentativas utilizando uma cepa termo-sensível de *T. gondii* (ts-4), demonstrou que animais imunizados e desafiados com a cepa M-7741, apresentaram uma sobrevivência de 88%, porém não se tem relatos da determinação do número de cistos e o grau de lesão no cérebro desses animais (WALDELAND *et al.*, 1983). Estudos apontam que a imunização com esse tipo de cepa apresentou alta virulência em animais jovens, o que dificulta seu uso como vacina, por perdas fetais e em animais jovens de diferentes espécies (PINCKNEY *et al.*, 1995; JUNGENSEN *et al.*, 2001). Atualmente a única vacina comercialmente utilizada é a Toxovax[®], produzida a partir de parasitas da cepa S48, isolada de membranas fetais de um aborto ovino e, após 3.000 passagens em camundongos, perdeu a sua habilidade de desenvolver cistos

teciduais. Esta vacina viva é amplamente utilizada no Reino Unido e Nova Zelândia, prevenindo o abortamento ovino e garantindo uma proteção durante 18 meses, mas se recomenda a revacinação anual (BUXTON, 1993). Porém a utilização dessa vacinas apresenta problemas de logística, como transporte e conservação das amostras. O uso limitado da Toxovax[®] deve-se ao fato da necessidade de imunização imediata de todo o rebanho no momento da chegada das amostras, o que passa a ser inviável sua utilização e manipulação em outros países.

Outro fator importante é a questão do comprometimento ocular causado pela toxoplasmose. O grau de lesão e seu comprometimento variam muito de acordo com a região atingida. Em estudos realizados por nosso grupo, podemos observar que hamsters, previamente imunizados com taquizoítos irradiados, foram eficientes na prevenção do comprometimento ocular, com diminuição de focos de lesões na retina de animais desafiados (CURSINO, 2007), sugerindo que uma vacina sem cistos não induzirá no futuro lesões de imunidade cruzada ocular.

Além de todos os problemas causados pela toxoplasmose e aqui levantados, existem estudos que sugerem que a infecção pelo *T. gondii* pode promover alteração no comportamento do hospedeiro infectado. Diversos trabalhos, com populações humanas, já demonstraram alterações comportamentais entre grupos soro positivos para o *T. gondii* entre grupos controles negativos, como maior incidência de acidentes de trânsito e alteração de personalidade (FLEGR, 2007; FLEGR *et al.*, 1996). O mesmo estudo também já foi realizado em animais, onde foi possível observar modificação da ansiedade e processo cognitivo (WEBSTER, 2007), o que os torna mais suscetíveis aos predadores (LAMBERTON *et al.*, 2008). Se confirmados, esses dados podem transformar a toxoplasmose em um grande problema de saúde pública no futuro, mas impedindo o uso de uma vacina humana,

pois será necessário esclarecer o mecanismo de desencadeamento destas alterações de comportamento antes de permitir o uso de vacina em humanos.

Estudos realizados nos Estados Unidos, utilizando gatos vacinados com bradizoítos livres da cepa mutante T-263, reduziram a exposição do *T. gondii* em suínos, demonstrando a importância da vacinação dos gatos na prevenção da transmissão da doença (MATEUS-PINILLA *et al.*, 1999). A interrupção da cadeia de transmissão para animais de produção, em geral herbívoros e dependentes da ingestão de oocistos produzidos por gatos, seria a melhor forma de evitar a toxoplasmose humana. Esta seria bloqueada sem evitar a ingestão de carne que não pode ser evitada por problemas nutricionais e também ocorreria uma diminuição progressiva da contaminação de águas potáveis, pela menor disponibilidade de oocistos produzidos por felinos livres. O tratamento da água em grandes cidades envolve processos de decantação e sedimentação, mas os oocistos são flutuantes e não são sensíveis a cloração habitual das águas, mais voltada para agentes virais e bacterianos (GAJADHAR *et al.*, 2006; SMITH & NICHOLS, 2006).

Todos estes dados mostram a aplicação prática de desenvolvimento de uma vacina oral para toxoplasmose para uso em felinos. Esta vacina poderia ser utilizada como iscas atrativas para os gatos livres do ambiente, como os de rua ou de vida livre selvagem, promovendo uma diminuição da excreção de oocistos por eles e assim reduzindo a transmissão ambiental da toxoplasmose, sem os riscos de intervenção direta nas populações humanas. No caso de animais carnívoros o uso de iscas como veículo para distribuição de imunógenos vem sendo utilizada com sucesso há alguns anos na vacinação da raiva (RABORAL VR-G®). Esta vacina produzida nos Estados Unidos utiliza um vetor viral recombinante e farinha de peixe ou comida para cão como veículos. Estas iscas são distribuídas em grandes áreas

para a imunização de cães, gatos, raposas entre outros animais com efetiva segurança e resultados eficazes, contribuindo com o controle da raiva em muitos países (MACKOWIAK *et al.*, 1999). Porém vale ressaltar que esse tipo de abordagem não favorece animais ruminantes, por apresentarem um sistema digestivo compartimentado, sendo a imunização intranasal uma alternativa para imunização de mucosas nesses modelos.

Estudos de conservação do parasita e distribuição das vacinas no ambiente devem ser realizados com o objetivo de atingir o maior número de animais selvagens, que seguramente em médio prazo, será responsável pela interrupção do ciclo da doença e conseqüentemente uma melhoria na qualidade de vida das populações, reduzindo a transmissão ambiental e perdas econômicas.

VI CONCLUSÕES

Geral

Nossos resultados mostraram que a imunização, com taquizoítos irradiados a 255 Gy, induziu resposta imune protetora em camundongos, com produção de citocinas e anticorpos, com participação do IFN- γ na proteção a infecção.

Especificamente, quanto ao uso de imunização oral com taquizoítos de *T. gondii* irradiados.

A funcionalidade celular do parasita irradiado é mantida no processo de vacinação oral, mesmo após a ação das enzimas estomacais, com invasão dos enterócitos e subsequente morte do parasita.

Há sempre produção significativa de IgG sérica específica após imunização oral, embora em níveis inferiores ao da imunização parenteral.

Houve sempre produção significativa de anticorpos IgA específicos no soro de camundongos imunizados por via oral, sendo semelhante ou maior que a imunização parenteral.

Houve menor produção de IgM sérica após imunização por via oral nos modelos estudados, diferentemente do que ocorreu na imunização parenteral.

A IgG2b foi a subclasse mais produzida de IgG após imunização oral, semelhante a imunização parenteral.

A maturação da avidéz de IgG foi mais lenta na imunização por via oral que na imunização parenteral.

Houve excreção de IgG, IgA e IgM nas fezes dos animais imunizados por via oral, em geral mais intensa que em animais imunizados por via parenteral.

Na imunidade celular envolvida na imunização por via oral, houve um aumento na produção de IFN- γ por células esplênicas, com níveis menores de produção de IL-2, IL-10 e IL-4.

Na imunidade celular intestinal em animais imunizados por via oral, houve padrão diferente de produção de citocinas, com menor produção de IFN- γ e produção maior de IL-2.

Os animais imunizados e desafiados com agentes viáveis apresentaram proteção significativa com diminuição de número de cistos cerebrais, em especial os animais BALB/c.

Por estudos em animais geneticamente deficientes de IFN- γ , a vacinação oral induz uma proteção parcial com maior número de cistos cerebrais e maior tempo de sobrevivência dos animais.

Houve produção de IgG e IgA específicos no soro dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$, sugerindo participação destes anticorpos na proteção parcial utilizada.

Houve excreção de IgA e IgM nas fezes de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ imunizados.

VII – REFERÊNCIAS

- ANTUNES, C.M.F., KATZ, N., ANDRADE, R.M., NETO, E.M. & LIMA, J.M. Study of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 13: 383-386, 1971.
- ARAUJO, F.G. Immunization against *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Today.**, 10(9): 358-360, 1994.
- BAKAL, P.M. & VELD, N. Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strain RH. **Z. Parasitenkd.**, 59(3): 211-217, 1979.
- BAPTISTA, J.A., SPENCER, P.J., OLIVEIRA, J.E., CASARE, M.S. & NASCIMENTO, N. Immune response against antigens irradiated with ⁶⁰Co gamma-rays. **J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry.**, 269(3): 565-569, 2006.
- BEAMAN, M.H., WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S. Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. **Immunol.**, 127:97-117, 1992.
- BERDOY, M., WEBSTER, J.P. & MACDONALD, D.W. Parasite-altered behaviour: is effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific?. **Parasitology**, 111(Pt 4): 403-409, 1995.
- BOHNE, W., HEESEMANN, J. & GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infect. Immun.**, 61(3): 1141-1145, 1993.
- BÓIA, M.N., CARVALHO-COSTA, F.A., SODRÉ, F.C., PINTO, G.M. & AMENDOEIRA, M.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, 50(1): 17-20, 2008.

- BOOTH, K.S.; JAMES, E.R.; POPIEL, I. Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Cryobiology**, 33(3): 330-337, 1996.
- BOURGUIN, I., CHARDÈS, T. & BOUT D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57Bl/6 mice. **Infect. Immun.**, 61(5): 2082-2088, 1993.
- BOURGUIN, I., CHARDES, T., MEVELEC, M.N., WOODMAN, J.P. & BOUT, D. Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using cholera toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, 65(3): 265-271, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 7(72): 248-254, 1976.
- BRAYDEN, D.J., JEPSON, M.A. & BAIRD, A.W. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. **Drug Discov. Today.**, 10(17): 1145-1157, 2005.
- BUTLER, J., LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. **Radiat. Phys. Chem.**, 24(3-4): 273-282, 1984.
- BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitol.Today.**, 9(9): 335-337, 1993.
- BUZONI-GATEL, D., SCHULTHESS, J., MENARD, L.C. & KASPER, L.H. Mucosal defence against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cell. Microbiol.**, 8(4): 535-544, 2006.

- BUZONI-GATEL, D., LEPAGE, A.C., DIMIER-POISSON, I.H., BOUT, D.T. & KASPER, L.H. (1997). Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, 158(12): 5883-5889, 1997.
- CAETANO, B.C., BRUNA-ROMERO, O., FUX, B., MENDES, E.A., PENIDO, M.L. & GAZZINELLI, R.T. Vaccination with Replication-Deficient Recombinant Adenoviruses Encoding the Main Surface Antigens of *Toxoplasma gondii* Induces Immune Response and Protection Against Infection in Mice. **Hum. Gene Ther.**, 17(4): 415-426, 2006.
- CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W., MINEO, J.R., TAKIGUTI, C.K. & NAKAHARA, O.S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infect. Immun.**, 21: 55-58, 1978.
- CARDI, B.A., NASCIMENTO, N., ANDRADE Jr, H.F. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ^{60}Co gamma rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. **Int. J. Radiat. Biol.**, 7(5): 557-564, 1998.
- CARMO, C.V. Avaliação da formação *in vitro* de cistos de cepas de *Toxoplasma gondii* com diferentes perfis genéticos induzidos por temperatura. 2006. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nat. Rev. Immunol.**, 8(6): 421-434, 2008.
- CHA, D.Y., SONG, I.K., LEE, G.S., HWANG, O.S., NOH, H.J., YEO, S.D., SHIN, D.W. & Lee, Y.H. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. **Korean J. Parasitol.**, 39: 233-240, 2001.

- CHEN, M., MUN, H.S., PIAO, L.X., AOSAI, F., NOROSE, K., MOHAMED, R.M., BELAL, U.S., FANG, H., AHMED, A.K., KANG, H.K., MATSUZAKI, G., KITAMURA, D. & YANO, A. Induction of protective immunity by primed B-1 cells in *Toxoplasma gondii* – infected B cell-deficient mice. **Microbiol. Immunol.**, 47: 997-1003, 2003a.
- CHEN, M., AOSAI, F., NOROSE, K., MUN, H.S., YANO, A. The role of anti-HSP70 autoantibody-forming V(H)1-J(H)1 B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Int. Immunol.**, 15(1): 39-47, 2003b.
- CLARK, J.D. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
- CLUMECK, N., SONNET, J., TAELEMAN, H., MASCART-LEMONE, F., DE BRUYERE, M., VANDEPERRE, P., DASNOY, J., MARCELIS, L., LAMY, M., JONAS, C. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. **N. Engl. J. Med.**, 310(8): 492-497, 1984.
- COLLAZO, C.M., YAP, G.S., SEMPOWSKI, G.D., LUSBY, K.C., TESSAROLLO, L., WOUDE, G.F., SHER, A. & TAYLOR, G.A. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. **J. Exp. Med.**, 194: 181-188, 2001.
- COUPER, K.N., ROBERTS, C.W., BROMBACHER, F., ALEXANDER, J. & JOHNSON, L.L. *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. **Infect Immun.**, 73(12): 8060-8068, 2005.
- COUSINS, D.J., LEE, T.H. & STAYNOV, D.Z. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. **J. Immunol.**, 169(5): 2498-2506, 2002.

- COUTO, W.J., BRANCO, J.N.R., ALMEIDA, D., CARVALHO, A.C., VICK, R., TELES, C.A., AGUIAR, L.F. & BUFFOLO, E. (2001). Transplante cardíaco e infecção. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, 16: 141-151.
- CRIPPS, A.W., KYD, J.M. & FOXWELL, A.R. Vaccines and mucosal immunization. **Vaccine** 19: 2513-2515, 2001.
- CURSINO, S.R.T. Evidências sorológicas e experimentais da resposta autoimune humoral contra retina em uveítes causadas por *Toxoplasma gondii*. 2007. Tese. Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DAGHER, R. & LUCAS, K. Toxoplasmosis in the patients with cancer. **Infect. Med.**, 13: 998-1000, 1996.
- DAUTU, G., MUNYAKA, B., CARMEN, G., ZHANG, G., OMATA, Y., XUENAN, X., IGARASHI, M. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. **Exp. Parasitol.**, 116(3): 273-282, 2007.
- DENKERS, E.Y., BUTCHER, B.A., DEL RIO, L. & BENNOUNA, S. (2004). Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. **Int. J. Parasitol.**, 34: 411-421, 2004.
- DEROUIN, F. Pathogeny and immunological control of toxoplasmosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 25(12): 1163-1169, 1992.
- DUARTE, M.I.S. & ANDRADE JR., H.F. Toxoplasmose. In: Brasileiro Fo, G., Pitella, J.E.H., Pereira, F.E.L., Bambirra, E.A. & Barbosa, A.I.A. (eds). Bogliolo Patologia, 7ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 1373-1380, 2006.

- DUARTE, M.I., MARIANO, O.N., TAKAKURA, C.F., EVERSON, D. & CORBETT, C.E. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. **Ultrastruct. Pathol.**, 16(4): 475-482, 1992.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. & SPEER, C.A. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11 (2): 267-299, 1998a.
- DUBEY, J.P.; THAYER, D.W.; SPEER, C.A.; SHEN, S.K. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. **Int. J. Parasitol.**, 28(3): 369-375, 1998b.
- DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Vet. Parasitol.**, 64: 65-70, 1996a.
- DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; THAYER, D.W.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. **J. Parasitol.**, 82(5): 724-727, 1996b.
- DUBEY, J.P. BRAKE, R.J., MURRELL, K.D. & FAYER, R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **Am. J. Vet. Res.**, 47(3): 518-522, 1986.
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*, **J. Parasitol.**, 56: 447-456, 1970.
- EGAN, J.E., HOFFMAN, S.L., HAYNES, J.D., SADOFF, J.C., SCHNEIDER, I., GRAU, G.E., HOLLINGDALE, M.R., BALLOU, W.R. & GORDON, D.M. Humoral immune response in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 49: 166-173, 1993.

- ERICKSON, M.C & ORTEGA, Y.R. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. **J. Food Prot.**, 69(11):2786-808, 2006.
- FAGARASAN, S. & HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. **Nat. Rev. Immunol.**,3(1): 63-72.
- FARIA, A.M. & WEINER, H.L. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, 206: 232-259, 2005.
- FLEGR, J. Effects of toxoplasma on human behavior. **Schizophr. Bull.**, 33(3): 757-760, 2007.
- FLEGR, J., ZITKOVÁ, S., KODYM, P. & FRYNTA, D. Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, 113(Pt 1): 49-54, 1996.
- FRANCO, M.A., TIN, C., ROTT, L.S., VANCOTT, J.L., McGHEE, J.R. & GREENBERG, H.B. Evidence for CD8+ T-cell immunity to murine rotavirus in the absence of perforin, fas, and gamma interferon. **J. Virol.**, 71(1): 479-846, 1997.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. & MILLER, N.Y. *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. **Science**, 164: 432-433, 1969.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. & MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, 167(919): 893-896, 1970.
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCÓN, J., CASTELLS, D., CORREA, O. & CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Vet. Parasitol.**, 81(1): 85-88, 1999.

- GADDI, P.J. & YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunol Cell Biol.**, 85(2): 155-159, 2007.
- GAJADHAR, A.A., SCANDRETT, W.B. & FORBES, L.B. Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. **Rev. Sci. Tech.**, 25(2): 595-606, 2006.
- GALISTEO JR., A.J., HIRAMOTO, R.M., CARMO, C.V., ALVES, J.B., ANDRADE JR., H.F. 255Gy irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* induce intestinal immune response in C57Bl/6j mice immunized by oral route. **The International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2005)**. Santos –SP, 2005.
- GARCIA, J.S., NAVARRO, I.T., OGAWA, L., OLIVEIRA, R.C., GARCIA, S.M.F. & LEITE, J. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 32(6): 671-676, 1999.
- GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E.Y., HIENY, S., CASPAR, P., TRINCHIERI, G. & SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, 153(6): 2533-2543, 1994.
- GEROSA, F., PAGANIN, C., PERITT, D., PAIOLA, F., SCUPOLI, M.T., ASTE-AMEZAGA, M., FRANK, I., TRINCHIERI, G. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. **J. Exp. Med.** 183(6): 2559-2569, 1996.
- GILBERT, J.M., FULLER, A.L., SCOTT, T.C. & McDOUGALD, L.R. Biological effects of gamma-irradiation on laboratory and field isolates of *Eimeria tenella* (Protozoa; Coccidia). **Parasitol. Res.**, 84: 437-441, 1998.

- GLASNER, P.D., SILVEIRA, C., KRUSZON-MORAN, D., MARTINS, M.C., BURNIER JUNIOR, M., SILVEIRA, S., CAMARGO, M.E., NUSSENBLATT, R.B., KASLOW, R.A. & BELFORT JUNIOR, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **Am. J. Ophthalmol.**, 114(2): 136-144, 1992.
- GODARD, I., DARCY, F., DESLEE, D., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: Kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. **Infect. Immun.**, 58(8): 2446-2451, 1990.
- GOTTSTEIN, B. *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, 65 (Suppl): 89S-95S, 1995.
- GRAS, L., WALLON, M., POLLAK, A., CORTINA-BORJA, M., EVENGARD, B., HAYDE, M., PETERSEN, E., GILBERT, R. & European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. **Acta Paediatr.**, 94(12): 1721-1731, 2005.
- GROSH, D.S. & HOOPYWOOD, L.E. Biological effects of radiation. 2th ed. New York, Academic Press, 1979.
- GUIMARÃES, A.C.S., KAWARABAY, M., BORGES, M.M., TOLEZANO, J.E. & ANDRADE JR, H.F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 35(6): 479-483, 1993.
- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A. Radiation-induced signal transduction and stress response. **Radiat. Res.**, 150(Suppl 5): S102-108, 1998.

- HAVLICEK, J., GASOVA, Z.G., SMITH, A.P., ZVARA, K. & FLEGR, J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. **Parasitology**, 122(Pt 5): 515-520, 2001.
- HEDMAN, K., LAPPALAINEN, M., SEPPÄÄIÄ, I. & MÄKELÄ, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.**, 159(4):736-40, 1989.
- HEGAB, S.M. & AL-MUTAWA, A.S. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clin. Exp. Med.**, 3(2): 84-105, 2003.
- HIRAMOTO, R.M., GALISTEO JR., A.J., DO NASCIMENTO, N. & ANDRADE JR., H.F. 200Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. **Vaccine**, 20(16): 2072-2081, 2002.
- HIRAMOTO, R.M., MAYBAURL-BORGES, M., GALISTEO JR., A.J., MEIRELES, L.R., MACRE, M.S. & ANDRADE JR., H.F. Infectivity of cysts of the ME49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Rev. Saude Publica**. 35(2):113-8, 2001.
- HOLMGREN, J. & CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat .Med.** 11(4 Suppl): S45-S53, 2005.
- HRDÁ, S., VOTYPKA, J., KODYM, P. & FLEGR, J. (2000). Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. **J. Parasitol.**, 86(4): 657-663, 2000.
- HSIEH, C., MACATONIA, S.E., O'GARRA, A. & MURPHY, K.M. (1995). T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*. **J. Exp. Med.**, 181(2): 713-721, 1995.

- HSU, H.W., GRADY, G.F., MAGUIRE, J.H., WEIBLEN, B.J. & HOFF, R. Newborn screening for congenital *Toxoplasma* infection: five years experience in Massachusetts, USA. **Scand. J. Infect. Dis.**, 84(suppl.): 59-64, 1992.
- HUDSON, L.; HAY, F.C. Practical Immunology. Oxford, p. 348-350, 1989.
- HUTCHISON, W.M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, 206: 961-962, 1965.
- IGARASHI, M., KANO, F., TAMEKUNI, K., MACHADO, R.Z., NAVARRO, I.T., VIDOTTO, O., VIDOTTO, M.C. & GARCIA, J.L. *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, 118(3): 386-392, 2008.
- ISRAELSKI, D.M. & REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clin. Infect. Dis.**, 17(suppl 2): S423-S435, 1993.
- JACOBS, L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. **Adv. Parasitol.**, 5: 1-45, 1967.
- JANKOVIC, D., SHER, A. & YAP, G. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. **Curr. Opin. Immunol.**, 13(4):403-409, 2001.
- JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of maula lutea in eye of normal dimensions, and microphthalmic eye, with parasites in the retina. **Cas. Lék. Cesk.**, 62: 1021-1027, 1923.
- JIANG, J.Q., HE, X.S., FENG, N., GREENBERG, H.B. Qualitative and quantitative characteristics of rotavirus-specific CD8 T cells vary depending on the route of infection. **J. Virol.**, 82(14): 6812-6819. Epub 2008 May 14, 2008.

- JUNGERSEN, G., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, L. & LIND, P. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. **J. Parasitol.**, 87(1): 108-113, 2001.
- KANG, H., REMINGTON, J.S. & SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. **J. Immunol.**, 164(5): 2629-2634, 2000.
- KAR, N. & MISRA, B. Toxoplasma seropositivity and depression: a case report. **BMC Psychiatry**, 4(1): 1, 2004.
- KASPER, L., COURRET, N., DARCHE, S., LUANGSAY, S., MENNECHET, F., MINNS, L., RACHINEL, N., RINET, C. & BUZONI-GATEL, D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Int. J. Parasitol.** 34(3): 401-409, 2004.
- KASPER, L.H. & BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. **Parasitol. Today**, 14: 150-156, 1998.
- KRAEHEHNBUEHL, J.P. & NEUTRA, M.R. Epithelial M cells: differentiation and function. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, 16: 301-332, 2000
- LAMBERTON, P.H, DONNELLY, C.A. & WEBSTER, J.P. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. **Parasitology**, 14: 1-8, 2008.
- LANG, C., GROSS, U., LÜDER, C.G. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, 100(2): 191-203, 2006.
- LAROCQUE, R., NAKAGAKI, K., LEE, P., ABDUL-WAHID, A. & FAUBERT, G.M. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst

- wall protein inhibits shedding of cysts. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. **Infect. Immun.**, 71(10): 5662-5669, 2003.
- LEE, Y.H., SHIN, D.W., LEE, J.H., NAM, H.W. & AHN, M.H. Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. **Yonsei Med. J.**, 48(3): 396-404, 2007.
- LEPAGE, A.C., BUZONI-GATEL, D., BOUT, D.T., KASPER, L.H. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 161(9): 4902-4908, 1998.
- LI, T., TAKEDA, N., MIYAMURA, T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. **Vaccine** 19(25-26): 3476-3484, 2001.
- LINDOVÁ, J., NOVOTNÁ, M., HAVLÍČEK, J., JOZÍFKOVÁ, E., SKALLOVÁ, A., KOLBEKOVÁ, P., HODNÝ, Z., KODYM, P. & FLEGR, J. Gender differences in behavioural changes induced by latent toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, 36(14): 1485-1492, 2006.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)). **Methods.** 25(4): 402-408, 2001.
- LOPES, F.M., GONÇALVES, D.D., DOS REIS, C.R., BREGANÓ, R.M., FREIRE, R.L., DE FREITAS, J.C. & NAVARRO, I.T. Presence of domesticated cats and visual impairment associated to *Toxoplasma gondii* serum positive children at an elementary school in Jataizinho, state of Paraná, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 17(1): 12-15.

- LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S. Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, 15: 211-222, 1992.
- MACK, D.G. & McLEOD, R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. **J. Clin. Invest.** 90(6): 2585-2592, 1992.
- MACKOWIAK, M., MAKI, J., MOTES-KREIMEYER, L., HARBIN, T. & VAN KAMPEN, K. Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology. **Adv. Vet. Med.**, 41: 571-583, 1999.
- MAGNO, R.C., STRAKER, L.C., DE SOUZA, W. & ATTIAS, M. Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. **Microsc. Microanal.**, 11: 166-174, 2005.
- MARTIN R.M. & LEW A.M. Is IgG2a a good Th1 marker in mice?. **Immunol. Today.** 19(1): 49, 1998.
- MARTINEZ-SILVA, R., LÓPEZ, V.A., COLÓN, J.I. & CHIRIBOGA, J. *Trypanosoma cruzi*: effects of gamma radiation on growth and infectivity. **Exp. Parasitol.**, 25: 162-170, 1969.
- MARTINO, R., MAERTENS, J., BRETAGNE, S., ROVIRA, M., DECONINCK, E., ULLMANN, A.J., HELD, T. & CORDONNIER, C. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, 31(5): 1188-1194, 2000.
- MASCHKE, M., DIETRICH, U., PRUMBAUM, M., KASTRUP, O., TUROWSKI, B., SCHAEFER, U.W., DIENER, H.C. Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 23(11): 1167-1176, 1999.

- MATEUS-PINILLA, N.E., DUBEY, J.P., CHOROMANSKI, L. & WEIGEL, R.M. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. **J. Parasitol.**, 85(5): 855-860, 1999.
- MAYES, J.T., O'CONNOR, B.J., AVERY, R., CASTELLANI, W. & CAREY, W. Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, 21(3): 511-515, 1995.
- McCANNEL, C.A., HOLLAND, G.N., HELM, C.J., CORNELL, P.J., WINSTON, J.V. & RIMMER, T.G. Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. **Am. J. Ophthalmol.**, 121(1): 35-46, 1996.
- McLEOD, R. & MACK, D.G. Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 136(7): 2640-2643, 1986.
- McLEOD, R., EISENHAUER, P., MACK, D., BROWN, C., FILICE, G., SPITALNY, G. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, 142(9): 3247-3255, 1989.
- McMANUS, D.P. & LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin. Microbiol.**, 21(1): 225-242, 2008.
- MEIRELES, L.R., TSUTSUI, V.S., CARMO, C.V., GALISTEO Jr., A.J., HIRAMOTO, R.M., TEREOWICZ, H.C.K. & ANDRADE Jr., H.F. Quantitative *Toxoplasma gondii* oocyst detection by a modified Kato Katz test using Kinyoun staining (KKK) in ME49 strain experimentally infected cats. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 50(3): 187-190, 2008.
- MEIRELES, L.R., GALISTEO JR., A.J., POMPEU, E. & de ANDRADE, H.F. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Trop. Med. Int. Health.**, 9(8):876-81, 2004.

- MEIRELES, L.R. Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo. 2001. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MICHAELS, H.B. & HUNT, J.W. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. **Radiat. Res.**, 74: 23-34, 1978.
- MICHAELS, M.G., WALD, E.R., FRICKER, F.J., DEL NIDO, P.J. & ARMITAGE, J. Toxoplasmosis in pediatric recipients of heart transplants. **Clin. Infect. Dis.**, 14: 847-851, 1992.
- MILLER, N.Y., FRENKEL, J.K. & DUBEY, J.P. Oral infection with *Toxoplasma gondii* cysts and oocysts in felines, other mammals and in birds. **J. Parasitol.**, 58: 928-937, 1972.
- MORDUE, D.G., MONROY, F., La REGINA, M., DINARELLO, C.A. & SIBLEY, L.D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **J. Immunol.**, 167(8): 4574-4584, 2001.
- MORGADO, M.G., CAM, P., GRIS-LIEBE, C., CAZENAVE, P.A., JOUVIN-MARCHE, E. Further evidence that BALB/c and C57BL/6 gamma 2a genes originate from two distinct isotypes. **EMBO J.** 8(11):3245-51, 1989.
- MORRISON, W.I., BLACK, S.J., PARIS, J., HINSON, C.A. & WELLS, P.W. Protective immunity and specificity of antibody response elicited in cattle by irradiated *Trypanosoma brucei*. **Parasite Immunol.**, 4: 395-407, 1982.
- MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat. Rev. Immunol.**, 3(4): 331-341, 2003.

- MUELLER, A.K., DECKERT, M., HEISS, K., GOETZ, K., MATUSCHEWSKI, K., SCHLÜTER, D. Genetically attenuated *Plasmodium berghei* liver stages persist and elicit sterile protection primarily via CD8 T cells. **Am. J. Pathol.**, 171(1): 107-115, 2007.
- MURRAY, H. W. & COHN, Z.A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. **J. Exp. Med.**, 150: 938-949, 1979.
- NETO, E.C., ANETE, E., RUBIM, R., BRITES, A., SCHULTE, J., BECKER, D. & TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **Int. J. Epidemiol.**, 29(5): 941-947, 2000.
- NICKDEL, M.B., LYONS, R.E., ROBERTS, F., BROMBACHER, F., HUNTER, C.A., ALEXANDER, J. & Roberts, C.W. Intestinal pathology during acute toxoplasmosis is IL-4 dependent and unrelated to parasite burden. **Parasite Immunol.**, 26: 75-82, 2004.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du *gondii*. **C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.** 147: 763-766, 1908.
- NORHAGEN, G., ENGSTRÖM, P.E., HAMMARSTRÖM, L., SÖDER, P.O. & SMITH, C.I. Immunoglobulin levels in saliva in individuals with selective IgA deficiency: compensatory IgM secretion and its correlation with HLA and susceptibility to infections. **J. Clin. Immunol.**, 9(4):279-86, 1989.
- NUSSENZWEIG, R.S., VANDENBERG, J.P., MOST, J.P. & ORTON, C. Specificity of protective immunity procedures by X-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. **Nature**, 22: 488-489, 1969.

- O'GARRA, A & VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat. Rev. Immunol.**, 7(6):425-8, 2007.
- OGRA, P.L. & METECKY, H. Handbook of Mucosal Immunology. 1ª ed. Academic Press, San Diego. 766p, 1994.
- OKANLA, E.O., STUMPF, J.L. & DUSANIC, D.G. Resistance of mice immunized with irradiated and lyophilized stages of *Trypanosoma cruzi* to infections with metacyclics. **Int. J. Parasitol.**, 12: 251-256, 1982.
- OKAZAKI, K., Efeitos da radiação ionizante em células – Noções básicas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. CNEN/SP. São Paulo, 1995.
- OLSON, M.E., MORCK, D.W. & CERI, H. Preliminary data on the efficacy of a *Giardia* vaccine in puppies. **Can. Vet. J.**, 38(12): 777-779. 1997.
- OLSON, M.E., MORCK, D.W. & CERI, H. The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens. **Can. J. Vet. Res.**, 60: 249-256, 1996.
- OMATA, Y., TERADA, K., TAKA, A., ISAMIDA, T., KANDA, M. & SAITO, A. Positive evidence that anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody exists in the intestinal tract of infected cats and exerts protective activity against the infection. **Vet. Parasitol.**, 73(1-2): 1-11, 1997.
- ORJIH, A.U. & NUSSENZWEIG, R.S. Immunization against rodent malaria with cryopreserved irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29: 343-347, 1980.
- PASSOS, L.N., ARAÚJO-FILHO, O.F. & ANDRADE JUNIOR, H.F. Toxoplasma encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 42(3): 141-145, 2000.

- PAVIA, C.S. Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. **J. Immunol.**, 137: 2985-2990, 1986.
- PETERSEN, E., POLLAK, A. & REITER-OWONA, I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, 31(2): 115-144, 2001.
- PINCHUK, L.M., FILIPOV, N.M. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. **Immun. Ageing.**, 11: 1-12, 2008.
- PINCKNEY, R.D, LINDSAY, D.S. & BLAGBURN, B.L. Further characterization of the TS-4 temperature-sensitive mutant of *Toxoplasma gondii* in mice. **J. Parasitol.**, 81(1):118-121.
- PINHO, J.R.R., CARDI, B.A., ANDRADE Jr, H.F., BARR, P.J., BATHURST, I.C., VICENTE, E.J. & SCHENBERG, A.C. Immunogenic properties of the *M. leprae* recombination 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. **Int. J. Leprosy**, 63(3): 381-390, 1995.
- RAVDIN, J.I. Protozoal Diseases. In: Mandell, G.L. Benett, J.E. & Dolin, R. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol. 2, 4th Edition, Churchill Livingstone, p: 2393-2395, 1995.
- REMYINGTON, J.S., McLEOD, R. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. & Klein, J.O (Ed.). Infectious Diseases of the fetus & newborn infant. 6th edition, W.B. Saunders Company, pp. 947-1091, 2005.
- RICHTER, D., HARN, D.A. & MATUSCHKA, F.R. The irradiated cercariae vaccine models: looking on the bright side of radiation. **Parasitol. Today**, 11: 288-293, 1995.

- ROBERTS, F. & McLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitol. Today**, 15(2): 51-57, 1999.
- ROBERTS, T., MURRELL, K.D. & MARKS, S. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitol. Today**, 10: 419-423, 1994.
- ROBERTS, T. & FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 196(2): 249-250, 1990.
- ROCHA, B. The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut. **Immunol. Rev.**, 215: 166-177, 2007.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **J. Amer. Med. Ass.**, 116: 801-807, 1941.
- SALATA, E., WIENDL., F.M. & CORRÊA, F.M.A. Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 15: 66-71, 1973.
- SANTO, A.H., PINHEIRO, C.E. & JORDANI, M.S. Aids as underlying and associated causes of death, State of S. Paulo, Brazil, 1998. **Rev. Saude Publica.**, 34(6): 581-588, 2000.
- SCHARTON-KERSTEN, T.M., YAP, G., MAGRAM, J. & SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.**, 185: 1261-1273, 1997.
- SCHELLER, L.F., STUMP, K.C. & AZAD, A.F. *Plasmodium berghei*: production and quantitation of hepatic stages derived from irradiated sporozoites in rats and mice. **J. Parasitol.**, 81: 58-62, 1995.

- SEAH, S.K. & HUCAL, G. The use of irradiated vaccine in immunization against experimental murine toxoplasmosis. **Can. J. Microbiol.**, 21(9): 1379-1385, 1975.
- SHEFFIELD, H.G. & MELTON, M.L. *Toxoplasma gondii*: transmission through feces in absence of *Toxocara cati* eggs. **Science**, 164: 431-432, 1969.
- SIBLEY, L.D. Recent origins among ancient parasites. **Vet. Parasitol.**, 115 (2): 185-198, 2003.
- SIBLEY, L.D., ADAMS, L.B., FUKUTOMI, Y. & KRAHENBUHL, J.L. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. **J. Immunol.**, 147: 2340-2345, 1991.
- SILVA, N.M., RODRIGUES, C.V., SANTORO, M.M., REIS, L.F., ALVARES-LEITE J.I. & GAZZINELLI, R.T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect. Immun.**, 70: 859-868, 2002.
- SMITH, H. & NICHOLS, R.A. Zoonotic protozoa--food for thought. **Parassitologia.**, 48(1-2): 101-104, 2006.
- SOUZA, V.A., PANNUTI, C.S., SUMITA, L.M. & de ANDRADE Jr, H.F. Enzyme-linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles vaccines. **J. Med. Virol.**, 52(3): 275-279, 1997.
- SPLENDRE A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesion anatomiche de'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminaire. **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, 3: 109-112, 1908.

- SUARÉZ-ARANDA, F., GALISTEO JR., A.J., HIRAMOTO, R.M., CARDOSO, R.P.A., MEIRELES, L.R., MIGUEL, O. & ANDRADE JR., H.F. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Vet. Parasitol.**, 91(1-2): 23-32, 2000.
- SUBAUSTE, C.S. & WESSENDARP, M. CD40 restrains in vivo growth of *Toxoplasma gondii* independently of gamma interferon. **Infect. Immun.**, 74(3): 1573-1579, 2006.
- SUZUKI, Y., YANG, Q., REMINGTON, J.S. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, 81(6): 1032-1034, 1995.
- SZABO, S.J., SULLIVAN, B.M., PENG, S.L. & GLIMCHER, L.H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, 21: 713-758, 2003.
- SZUMIEL, I. Ionizing radiation-induced cell death. **Int. J. Radiat. Biol.**, 66(4): 329-341, 1994.
- TANA, WATARAI, S., ISOGAI, E. & OGUMA, K. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. **Lett. Appl. Microbiol.** 36(3): 135-139, 2003.
- TAYLOR, S.M., MALLON, T.R. & GREEN, W.P. Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm. **Vet. Rec.**, 119(15): 370-372, 1986.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, 24:145-149, 1992.

- TRINCHIERI, G. (2007). Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, 204(2): 239-243, 2007.
- VAN EGMOND, M., DAMEN, C.A., VAN SPRIEL, A.B. VIDARSSON, G. VAN GARDEREN, E. & VAN DE WINKEL, J.G. IgA and IgA Fc receptor. **Trends Immunol.**, 22(4): 205-211, 2001.
- VAN KNAPEN, F., KREMERS, A.F., FRANCHIMONT, J.H. & NARUCKA, U. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrated control of livestock production. **Vet. Q.**, 17(3): 87-91, 1995.
- VELGE-ROUSSEL, F., CHARDÈS, T., MÉVÉLEC, P., BRILLARD, M., HOEBEKE, J. & BOUT, D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 66(1): 31-38, 1994.
- VENKATESAN, P. & WAKELIN, D. Elisass for parasitologists: or lies, damned lies and Elisass. **Parasitol. Today.**, 9(6): 228-232, 1993.
- WALDELAND, H., PFEFFERKORN, E.R. & FRENKEL, J.K. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: pathogenicity and persistence in mice. **J. Parasitol.**, 69(1): 171-175, 1983.
- WALES, A. & KUSEL, J.R. Biochemistry of irradiated Parasite vaccines: suggested models for their mode of action. **Parasitol. Today.**, 8(11): 358-363, 1992.
- WEBSTER, J.P. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. **Schizophr. Bull.**, 33(3): 752-756, 2007.
- WEBSTER, J.P., BRUNTON, C.F.A. & MACDONALD, D.W. Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, 109 (Pt 1): 37-43, 1994.

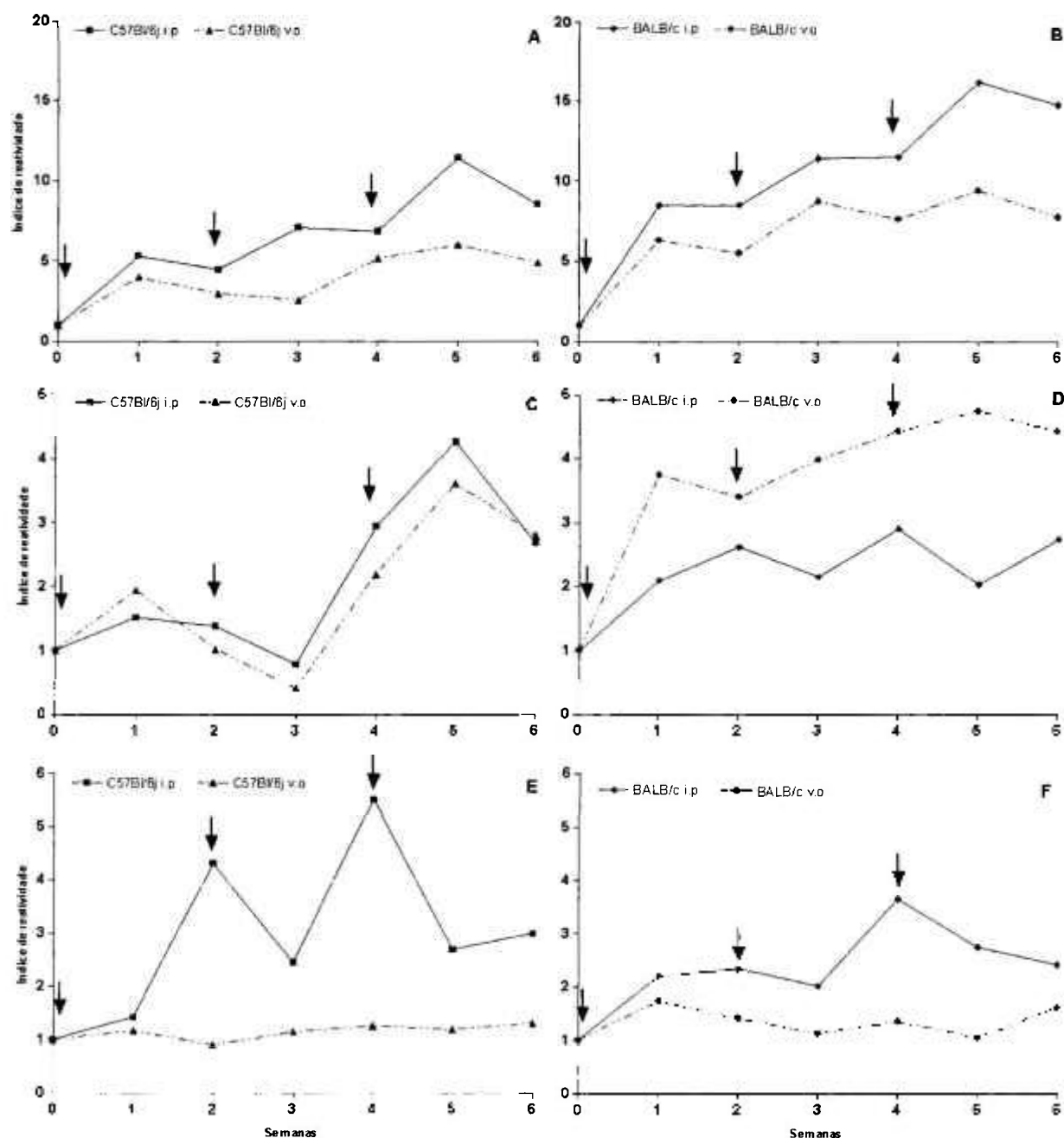
WEINER, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- beta-secreting regulatory cells. **Microbes. Infect.**, 3(11): 947-954, 2001.

WEISS, L. M. & KIM K. In: Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods. pp. 800. Academic Press; 1º ed. London, 2007.

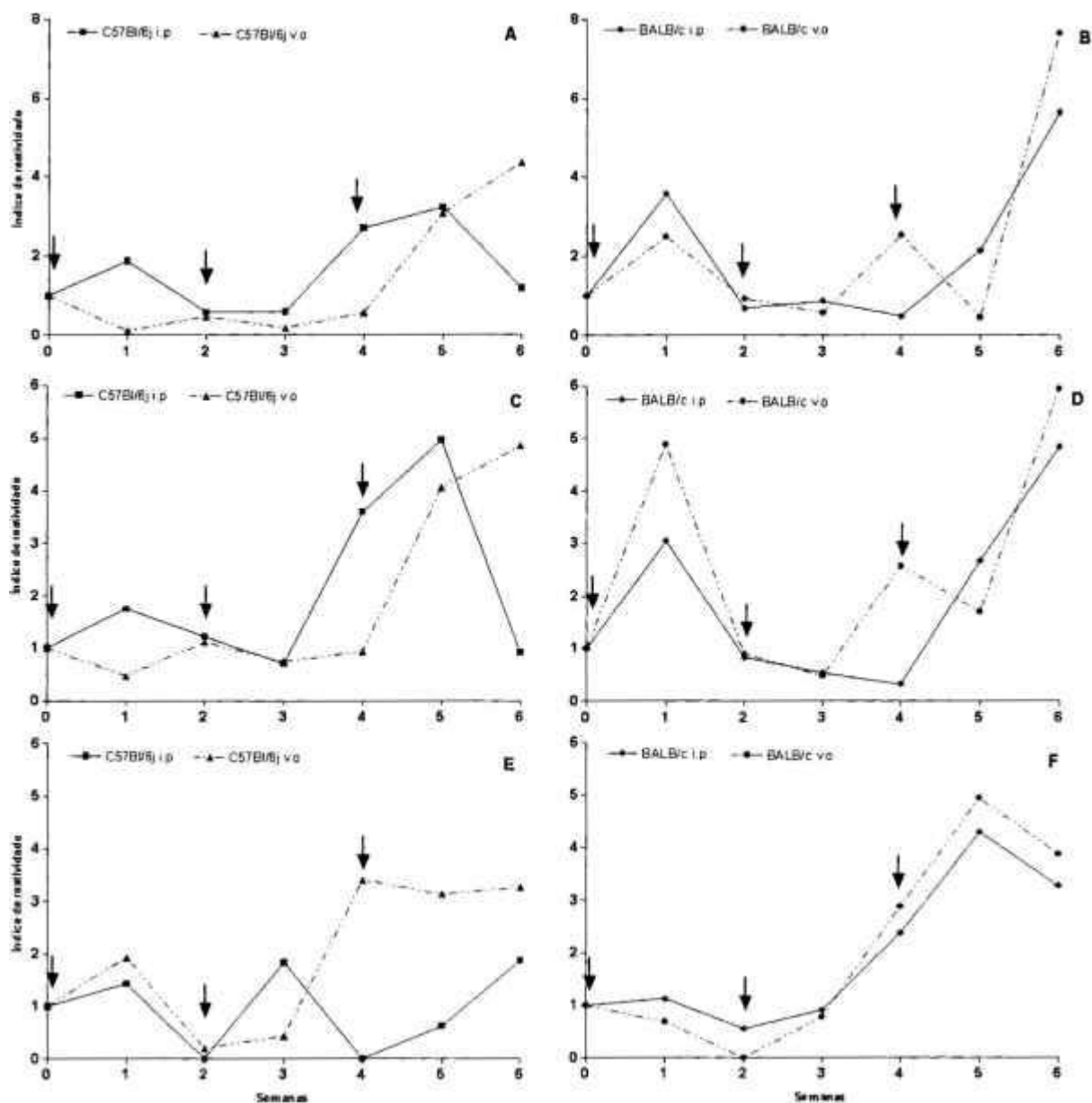
WONG, S.Y & REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**. 7(3): 299-316, 1993.

WOOF, J.M., MESTECKY, J. Mucosal immunoglobulins. **Immunol. Rev.**, 206: 64-82, 2005.

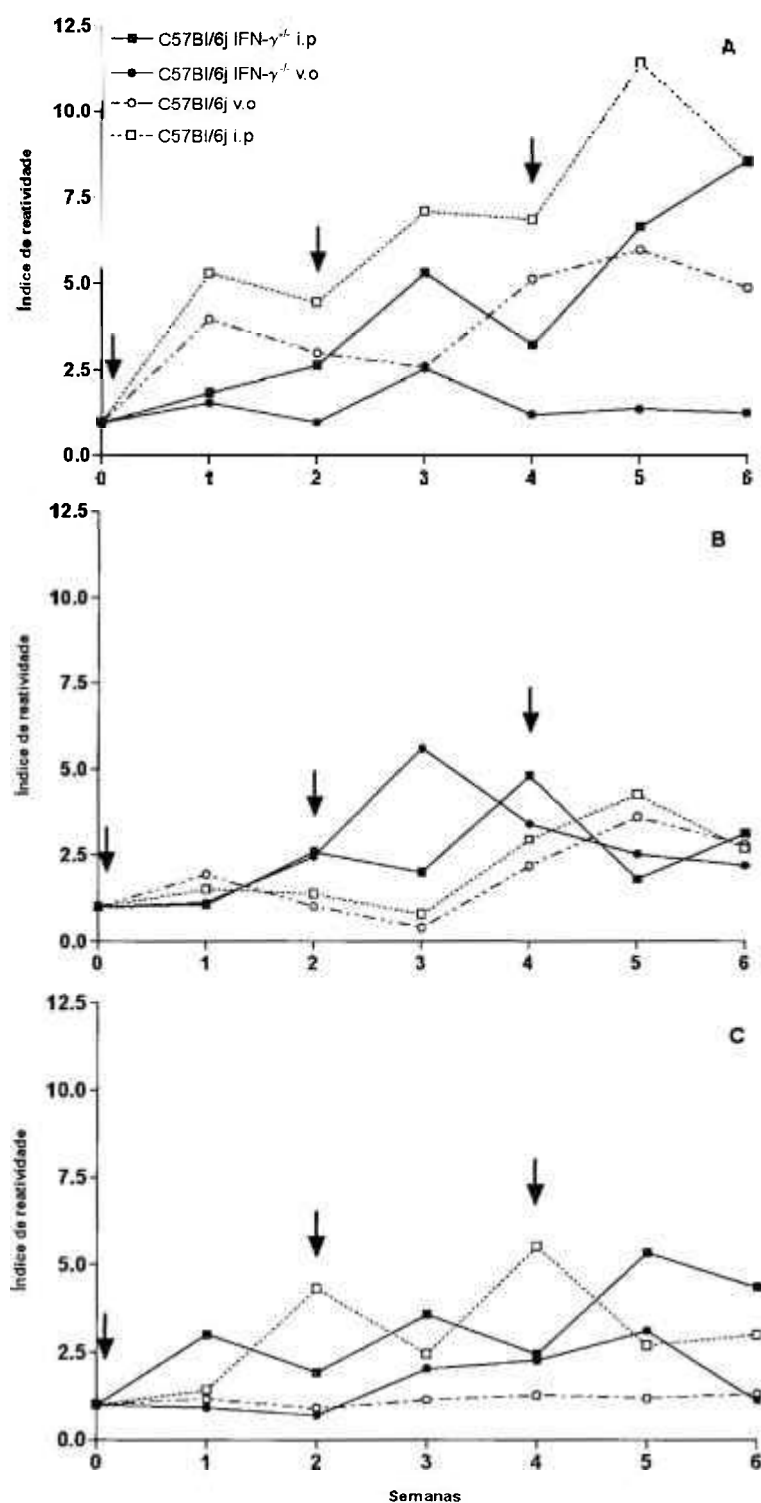
ANEXOS



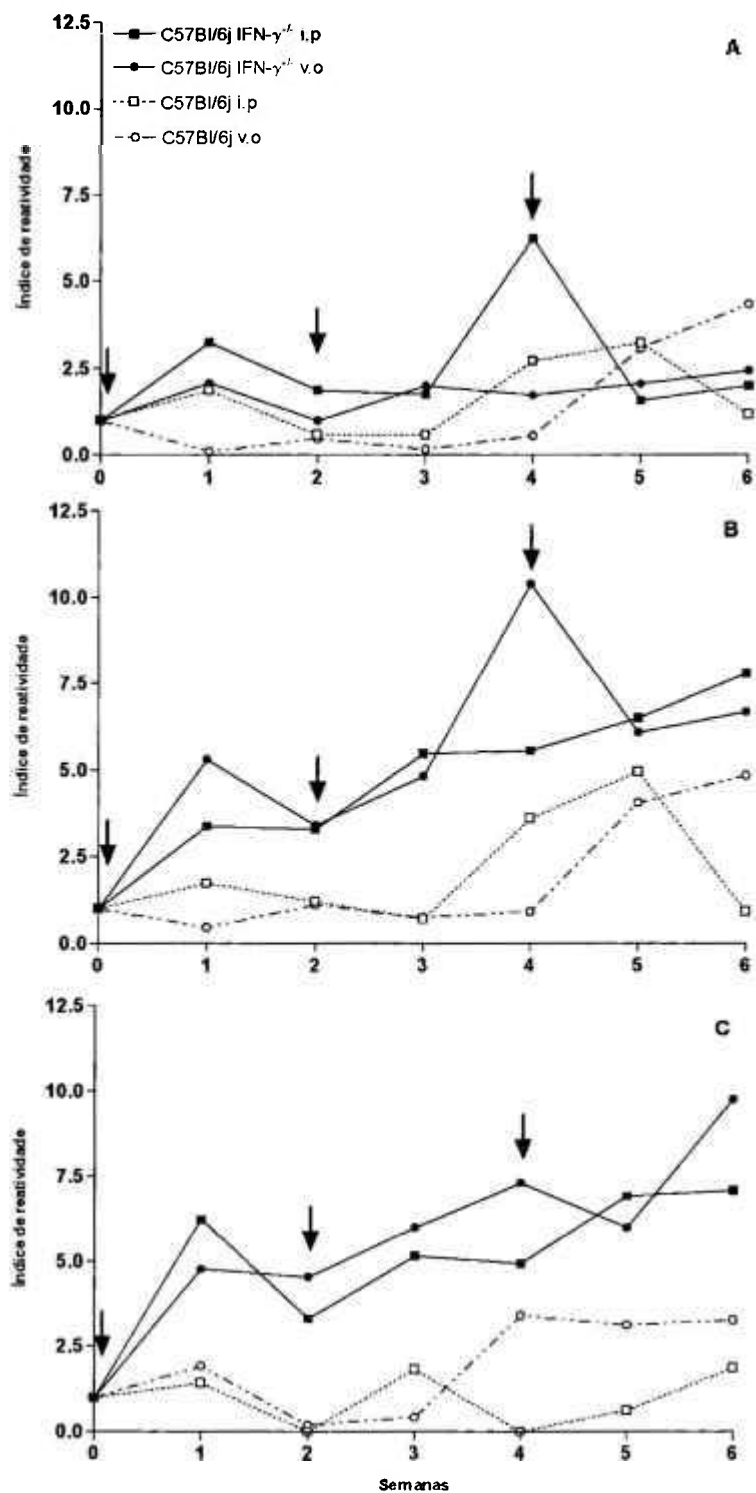
Anexo 1 – Produção de anticorpos IgG (A/B), IgA (C/D) e IgM (E/F), no soro de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.



Anexo 2 – Excreção de anticorpos IgG (A/B), IgA (C/D) e IgM (E/F), nas fezes de camundongos C57Bl/6j e BALB/c, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.



Anexo 3 – Produção de anticorpos IgG (A), IgA (B) e IgM (C) no soro de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.



Anexo 4 – Excreção de anticorpos IgG (A), S-IgA (B) e S-IgM (C) nas fezes de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, inoculados com 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255 Gy, v.o (com hidróxido de alumínio) ou i.p (sem veículo), detectada por ELISA. As setas indicam as datas dos inóculos.

Anexo 5 – Variação da expressão gênica de citocinas esplênicas por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy, mensurado por Real-time PCR. Valores de Ct e respectivas análises de expressão pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Grupos	Ct IFN-γ		Média	Ct β-actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	22.18	22.32	22.25	13.91	14.04	13.98	8.28	-7.70	139.64
C57Bl/6j (v.o)	29.21	28.66	28.94	17.35	16.55	16.95	11.99	-3.99	12.91
BALB/c (i.p)	21.80	22.01	21.91	13.65	13.62	13.64	8.27	-7.70	140.09
BALB/c (v.o)	22.35	22.90	22.63	14.24	13.91	14.08	8.55	-7.42	117.04
ME49	23.63	23.08	23.36	13.82	14.04	13.93	9.43	-6.55	66.75

Grupos	Ct IL-2		Média	Ct β-actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	26.13	26.53	26.33	13.91	14.04	13.98	12.36	-1.33	2.39
C57Bl/6j (v.o)	28.88	28.75	28.82	17.35	16.55	16.95	11.87	-1.82	3.30
BALB/c (i.p)	26.41	26.34	26.38	13.65	13.62	13.64	12.74	-0.94	1.86
BALB/c (v.o)	27.18	26.83	27.01	14.24	13.91	14.08	12.93	-0.75	1.64
ME49	27.19	27.82	27.51	13.82	14.04	13.93	13.58	-0.10	1.07

Grupos	Ct IL-4		Média	Ct β-actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	24.43	25.16	24.80	13.91	14.04	13.98	10.82	-2.42	4.97
C57Bl/6j (v.o)	27.75	30.15	28.95	17.35	16.55	16.95	12.00	-1.24	2.27
BALB/c (i.p)	21.41	21.52	21.47	13.65	13.62	13.64	7.83	-5.41	36.06
BALB/c (v.o)	25.98	26.12	26.05	14.24	13.91	14.08	11.98	-1.27	2.31
ME49	23.55	24.12	23.84	13.82	14.04	13.93	9.91	-3.34	9.12

Grupos	Ct IL-10		Média	Ct β-actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	21.11	20.95	21.03	13.91	14.04	13.98	7.06	-4.18	15.23
C57Bl/6j (v.o)	27.57	27.59	27.58	17.35	16.55	16.95	10.63	-0.60	1.48
BALB/c (i.p)	19.45	19.71	19.58	13.65	13.62	13.64	5.95	-5.29	31.42
BALB/c (v.o)	23.95	24.06	24.01	14.24	13.91	14.08	9.93	-1.30	2.34
ME49	22.31	22.04	22.18	13.82	14.04	13.93	8.25	7.92	7.01

Anexo 6 – Variação da expressão gênica de citocinas intestinais por Real-Time PCR, em camundongos C57Bl/6j e BALB/c, imunizados com *T. gondii* irradiado a 255Gy. Valores de Ct e respectivas análises de expressão pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Grupos	Ct IFN- γ		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	28.96	28.36	28.66	16.90	16.67	16.79	11.88	0.05	0.97
C57Bl/6j (v.o)	25.73	28.97	28.85	15.57	15.38	15.48	10.38	-1.45	2.53
BALB/c (i.p)	38.87	38.86	38.87	23.84	23.37	23.61	15.27	2.08	0.26
BALB/c (v.o)	28.22	28.24	28.23	15.91	15.90	15.91	12.33	-0.87	1.74
ME49	27.86	28.03	27.95	16.24	16.18	16.21	11.74	-0.09	1.06

Grupos	Ct IL-2		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	27.97	27.84	27.91	16.90	16.67	16.79	11.12	0.46	0.74
C57Bl/6j (v.o)	26.24	25.92	26.08	15.57	15.38	15.48	10.61	-0.06	1.04
BALB/c (i.p)	37.20	36.80	37.00	23.84	23.37	23.61	13.40	0.31	0.82
BALB/c (v.o)	27.48	28.08	27.78	15.91	15.90	15.91	11.88	-1.22	2.22
ME49	27.76	27.85	27.81	16.24	16.18	16.21	11.60	0.93	0.54

Grupos	Ct IL-4		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	30.45	29.79	30.12	16.9	16.67	16.79	13.34	-0.11	1.07
C57Bl/6j (v.o)	29.05	27.56	28.31	15.57	15.38	15.48	12.83	-0.61	1.50
BALB/c (i.p)	35.53	35.53	35.53	23.84	23.37	23.61	11.93	0.30	0.82
BALB/c (v.o)	28.6	30.52	29.56	15.91	15.9	15.91	13.66	2.03	0.26
ME49	30.13	30.77	30.45	16.24	16.18	16.21	14.24	0.80	0.59

Grupos	Ct IL-10		Média	Ct β -actina		Média	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
C57Bl/6j (i.p)	27.04	26.65	26.85	16.9	16.67	16.79	10.06	0.85	0.57
C57Bl/6j (v.o)	25.19	25.38	25.29	15.57	15.38	15.48	9.81	0.60	0.68
BALB/c (i.p)	36.0	34.37	35.19	23.84	23.37	23.61	11.58	-0.82	1.71
BALB/c (v.o)	28.49	28.6	28.55	15.91	15.9	15.91	12.64	0.24	0.86
ME49	26.34	26.18	26.26	16.24	16.18	16.21	10.05	0.84	0.58

QUANTITATIVE *Toxoplasma gondii* OOCYST DETECTION BY A MODIFIED KATO KATZ TEST USING KINYOUN STAINING (KKK) IN ME49 STRAIN EXPERIMENTALLY INFECTED CATS

Luciana Regina MEIRELES(1), Vinicius Suehiro TSUTSUI(1), Claudia Villano do CARMO(2), Andrés Jimenez GALISTEO Jr.(3), Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO(4), Henrique César Katsumi TARENTOWICZ(1) & Heitor Franco de ANDRADE JÚNIOR(1)

SUMMARY

We detected *Toxoplasma gondii* oocysts in feces of experimentally infected cats, using a Kato Katz approach with subsequent Kinyoun staining. Animals serologically negative to *T. gondii* were infected orally with 5×10^2 mice brain cysts of ME49 strain. Feces were collected daily from the 3rd to the 30th day after challenge. Oocysts were detected by qualitative sugar flotation and the quantitative modified Kato Katz stained by Kinyoun (KKK). In the experimentally infected cats, oocysts were detected from the 7th to 15th day through sugar flotation technique, but oocysts were found in KKK from the 6th to 16th day, being sensitive for a larger period, with permanent documentation. The peak of oocysts excretion occurred between the 8th to 11th days after challenge, before any serological positive result. KKK could be used in the screening and quantification of oocysts excretion in feces of suspected animals, with reduced handling of infective material, decreasing the possibility of environmental and operator contamination.

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*; Kato Katz; Kinyoun; Oocysts; Cat; Diagnosis.

INTRODUCTION

Humans become infected with *Toxoplasma gondii* mainly by ingesting uncooked meat containing viable tissue cysts or by ingesting food or water contaminated with oocysts from the feces of infected cats (DUBEY & BEATTIE, 1988). *T. gondii* oocysts are shed in large numbers by domestic cats and other members of the *Felidae* after ingesting prey or contaminated water (HILL & DUBEY, 2002). These oocysts mature in the environment and are disseminated through rain and surface water, resulting in widespread contamination of the environment (DUBEY & FRENKEL, 1972; DUBEY, 2001). Kittens are probably the major source of contamination as they are common and produce large numbers of oocysts (DUBEY & CARPENTER, 1993).

Waterborne outbreaks of acute toxoplasmosis worldwide reinforce the transmission of *T. gondii* to humans through water contaminated with oocysts and may have a greater epidemiological impact than previously believed (DUBEY & CARPENTER, 1993; KARANIS *et al.*, 2007). Findings regarding the prevalence of *Toxoplasma* oocysts in water are still rare and difficult (BOWIE *et al.*, 1997; ISAAC-RENTON *et al.*, 1998; DE MOURA *et al.*, 2006). Recently, new alternative methods have been proposed, but they involve numerous centrifuging and expensive reagents with molecular detection of *Toxoplasma* DNA (DUMETRE & DARDE, 2004; KOURENTI & KARANIS, 2006). For epidemiologic surveys, seroprevalence in cats

allows indirect estimation and are more feasible than oocyst fecal examination, providing an indicator of environmental contamination (MEIRELES *et al.*, 2004). Oocysts can be detected by examination of cat feces by concentration methods such as flotation in high-density sucrose solution, with risk of environmental and operator contamination due to extensive manipulation (DUBEY, 2004). Routine *Cryptosporidium* oocysts isolation in human feces uses a rapid modified-acid method, Kinyoun stain (AMATO NETO *et al.*, 1996), which allows clear identification of the infection with minimum of stool manipulation, but without quantification, which is a feature of the Kato-Katz test (KATZ *et al.*, 1972). We studied oocysts excretion in feces of experimentally infected cats by a combination of these methods, by Kinyoun staining of a thick quantitative smear after Kato-Katz, for detection and quantification.

MATERIAL AND METHODS

For experimental cat infection, recently weaned cats were fed with 5×10^3 cysts of ME-49 strain of *T. gondii* obtained from brains of previously inbred mice (HIRAMOTO *et al.*, 2002). The animals were maintained at the Institute of Tropical Medicine of São Paulo University, receiving commercial food and water *ad libitum* and their feces were daily collected to the 30th day post-challenge, with weekly bleeding under anesthesia. The cats were isolated and manipulated before or during the infection according to 'Principles of Laboratory Animal Care' (CLARK, 1996). Feces were examined daily by two methods.

(1) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

(2) Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

(3) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil.

(4) Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondence to: Heitor Franco de Andrade Jr, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil. E-mail: hfandrad@usp.br

Sugar flotation technique (SHEATHER, 1923) was performed in 5 g of feces mixed with 45 mL of a sugar solution (density 1.208) and centrifuged at 1,000 g for 10 minutes, and the surface film transferred to a slide. Oocyst search was performed by two independent observers, looking for 10 µm thick walled structures, containing cellular structures, as there is no maturation to sporozoites at this stage.

Feces were also processed by a modified Kato Katz stool collection, with subsequent Kinyoun staining (KKK). Briefly, a small amount of fecal material was placed on scrap paper and a piece of nylon sieve was pressed on top of it so that some of the feces sieved through the screen and accumulated on top of the 180 mesh nylon sieve. A spatula was scraped across the upper surface of the screen to collect the sieved feces. The spatula was used to deposit the feces in the orifice of the perforated plate on a microscope slide. The perpendicular 4x10x1 mm orifice was devised to contain exactly 0.04 g or 40 µL of feces, at one corner of the slide. The other side of the spatula was passed over a nylon sieve and over the perforated plate to remove excess feces. The plate was carefully removed by lifting, leaving behind a small square mould of sieved material. Opposite corner of other microscope slide was pressed on top of this, and a relatively thin smear was obtained by sliding over the slides in order to provide a thick smear in each slide. The material was air dried, heated and stained by Kinyoun method as described elsewhere (AMATO NETO *et al.*, 1996), with subsequent mounting. *T. gondii* oocysts appeared as red cystic structures with 10 µm diameter, with preservation of internal details. Oocyst frequency in the preparation was determined both by using a quick semi-quantitative method, scoring as (-) when no oocysts were found, (+) when at least one stained oocyst was found in the slide; (++) when rare stained oocysts were found in the slide but not in every field; (+++) when at least one stained oocyst was found in each 20X optical field and (+++++) when more than one stained oocyst were found in each 20X optical field. This analysis was easily performed in only one of the KKK slides by two independent observers. Quantitative determination was performed in both slides from each preparation for determination of total numbers of oocysts by two independent observers and the oocysts number per gram of feces determined assuming that the whole preparation in the two slides had 0.04 g of feces.

Serum specific anti *T. gondii* IgG was determined in weekly collected serum samples by a conventional ELISA, using microplate coated with saline extract from RH strain tachyzoites as elsewhere described (MEIRELES *et al.*, 2004) and expressed as titer, the inverse dilution of sera that gives 1.0 O.D. over control in the ELISA assay.

RESULTS

Oocyst identification by both methods is demonstrated in Fig. 1. Sucrose flotation allows demonstration of cystic structures, with 10 µm diameter clearly identified by contract phase microscopy, as shown in Fig. 1A. The Kato-Katz-Kinyoun (KKK) shows a clearly identified red structure, over a background of fecal contents, without any other acid fast stained structure, as could be seen in Fig. 1B, allowing also both identification and quantification.

Detection of *T. gondii* oocysts in the stools of four experimentally infected cats (two males and two females) fed with ME-49 *T. gondii* strains is shown in Fig. 2, associated to specific IgG titres. Oocysts

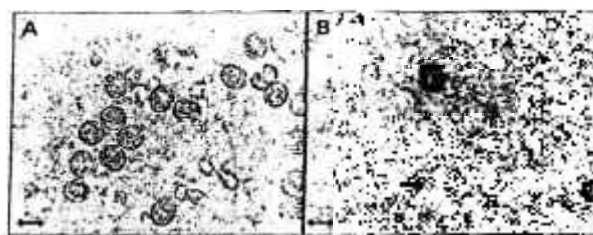


Fig. 1 - Representative images from stool detection of *T. gondii* immature oocysts. A - *T. gondii* oocysts in sucrose solution suspension. B - *T. gondii* oocyst stained by KKK. Bar = 10 µm.

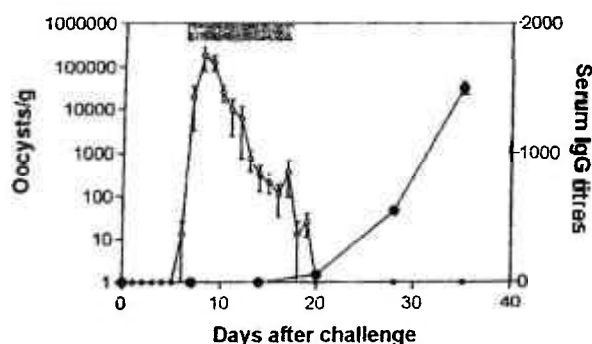


Fig. 2 - Quantitative mean oocyst excretion in cats experimentally infected with *T. gondii* ME-49 strain. Open dots: oocyst/g stools by KKK. Closed dots: mean anti *T. gondii* IgG antibody titres by ELISA. Shaded bar: period of oocyst detection by sucrose flotation. Bars represent SEM (Standard error of mean).

were detected from the 7th to 15th day through flotation technique, but KKK allowed detection of oocysts from the 6th to 16th day, with permanent documentation. Antibody titers were found in sera only after the declining of oocyst excretion which completely disappears after the 17th day of challenge in all animals. The excretion was absent after this period until the 30th day after challenge.

Oocyst excretion in individual animals are shown in Fig. 3, compared to KKK semi-quantitative estimation of oocysts, showing that the peak of excretion occurred in the 8th to 11th days after challenge in all individual animals. Quantitative analysis shows an early acute peak in all animals, with subsequent relatively slow decline, with an asymmetric profile, by both quantitative and semi-quantitative data. The oocyst excretion was very similar in all animals, with all cats showing at least one day with >10⁵ oocysts/gram of feces. There is a very good association between the semi-quantitative scoring in one slide and the quantitative data, allowing the use of this quick scoring system in the screening of samples for posterior study.

DISCUSSION

Toxoplasma oocysts identification is easily performed with our modification of Kato-Katz direct fecal examination test, allowing quick identification of the presence of oocyst with little equipment. Oocyst preservation in KKK also allows gross genera identification, due to the preservation of oocyst diameter, but more accurate studies other than morphology must be performed for adequate speciation, as elsewhere described (SHARES *et al.*, 2005). Without staining, the dried

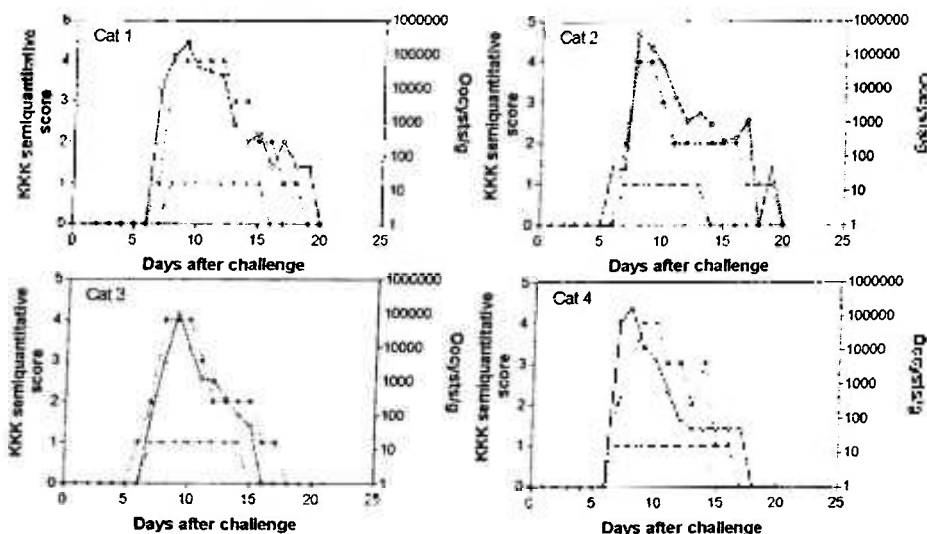


Fig. 3 - Quantitative stool detection of *T.gondii* oocysts in individual experimentally infected cats, as compared by three approaches: Open circles: KKK quantitative determination, Closed circles = KKK semi-quantitative scoring. Dashed line = sucrose flotation findings (0 = negative + = positive).

slide could be an alternative for nucleic acid preservation for genomic speciation, which could be performed by nucleic acid purification and adequate primers in PCR (SALANT *et al.*, 2007).

KKK involves few steps of manipulation of infective material, decreasing the possibility of environmental and operator contamination, destroying all viability of the oocysts. The sugar flotation technique has the disadvantage of multiple steps with infective material manipulation and centrifugation, increasing the risk of contamination. KKK also allow quantitative data to be read easily in field conditions, or transported without preservation due to the stable documentation, without new steps required for quantitative determination with sugar flotation. Other advantages of KKK include the small amount of feces required to perform the test as well as the low cost of the technique, together with its suitability for rapid use under field conditions, as the veterinary office.

Oocyst excretion in stools in our experimentally infected cats was short lived, with positive serology occurring after the main excretion of oocysts. These findings were reported elsewhere, despite some descriptions of persistent excretion in some models, ascribed to strains or parasite variation (DUBEY, 2005). Specific IgG serology only becomes evident after oocyst excretion, which results in poor diagnostic value for individual felids that are implicated as a source of *T. gondii* spreading, but it is a feasible technique for feline toxoplasmosis prevalence, with results related to a past excretion of oocysts and chronic infection (MEIRELES *et al.*, 2004, SALANT *et al.*, 2007).

Morphological approaches on *Toxoplasma* oocysts identification have been neglected in recent years, due to the upsurge of more precise technologies, but could be also useful for veterinary practice, for diagnosis or screening sick animals. We suggest that this modified technique could be introduced for screening and detection of oocyst excretion in feces of suspected animals, both in epidemiological and clinical studies.

RESUMO

Deteção quantitativa de oocistos de *Toxoplasma gondii*, por um teste modificado de Kato Katz usando coloração de Kinyoun (KKK), em gatos infectados experimentalmente com a cepa ME49

Detectamos oocistos de *Toxoplasma gondii* em fezes de gatos experimentalmente infectados, usando a abordagem de Kato Katz, com subsequente coloração pelo método de Kinyoun. Animais sorologicamente negativos ao *T. gondii* foram infectados por via oral com 5×10^2 cistos da cepa ME49 de cérebros de camundongos. Fezes foram colhidas diariamente a partir do 3º até o 30º dia pós-infecção. Oocistos foram detectados por centrifugo-flutuação em sacarose qualitativa e pelo método quantitativo de Kato Katz modificado corado pela técnica de Kinyoun (KKK). Em gatos experimentalmente infectados, oocistos foram detectados do 7º ao 15º dia pela técnica de centrifugo-flutuação em sacarose, mas oocistos foram detectados do 6º ao 16º dia pelo KKK, sendo sensível por um período maior, com documentação permanente. O pico da excreção de oocistos ocorreu entre 8º a 11º dia pós-infecção, antes de resultado sorológico positivo. KKK pode ser utilizado na triagem e quantificação da excreção de oocistos em fezes de animais suspeitos, com redução da manipulação de material infectante, diminuindo a possibilidade de contaminação ambiental e do operador.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully thank the skilled technical assistance of Roselaine Pereira Alvim Cardoso. This work was supported by LIMHCFMUSP49, CAPES and CNPQ.

REFERENCES

1. AMATO NETO, V.; BRAZ, L.M.A.; DI PIETRO, A.O. & MODULO, J.R. - Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp em fezes: comparação entre os métodos de Kinyoun modificado e de Heine. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 29: 575-578, 1996.
2. BOWIE, W.R.; KING, A.S.; WERKER, D.H. *et al.* - Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, 350: 173-177, 1997.
3. CLARK, J.D. - *Guide for the care and use of laboratory animals*. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington, National Academy Press, 1996.
4. DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WADA, M.Y. *et al.* - Waterborne toxoplasmosis. Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.*, 12: 326-329, 2006.
5. DUBEY, J.P. & BEATTIE, C.P. - *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, CRC Press, 1988.
6. DUBEY, J.P. & CARPENTER, J.L. - Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 203: 1546-1549, 1993.
7. DUBEY, J.P. & FRENKEL, J.K. - Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 19: 155-177, 1972.
8. 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. *J. Parasit.*, 87: 215-219, 2001.
9. DUBEY, J.P. - Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet. Parasit.*, 126: 57-72, 2004.
10. DUBEY, J.P. - Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: *in vivo* stage conversion and strain variation. *Vet. Parasit.*, 133: 289-298, 2005.
11. DUMETRE, A. & DARDE, M.L. - Purification of *Toxoplasma gondii* oocysts by cesium chloride gradient. *J. microbiol. Meth.*, 56: 427-430, 2004.
12. HILL, D. & DUBEY, J.P. - *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.*, 8: 634-640, 2002.
13. HIRAMOTO, R.M.; GALISTEO Jr., A.J.; NASCIMENTO, N. & ANDRADE Jr., H.F. - 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine*, 20: 2072-2081, 2002.
14. ISAAC-RENTON, J.; BOWIE, W.R.; KING, A. *et al.* - Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl. environm. Microbiol.*, 64: 2278-2280, 1998.
15. KATZ, N.; CHAVES, A. & PELLEGRINO, J. - A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 14: 397-400, 1972.
16. KARANIS, P.; KOURENTI, C. & SMITH, H. - Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Hlth.*, 5: 1-38, 2007.
17. KOURENTI, C. & KARANIS, P. - Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. *Let. appl. Microbiol.*, 43: 475-481, 2006.
18. MEIRELES, L.R.; GALISTEO Jr., A.J.; POMPEU, E. & ANDRADE Jr., H.F. - *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Trop. Med. int. Hlth.*, 9: 876-881, 2004.
19. SALANT, H.; MARKOVICS, A.; SPIRA, D.T. & HAMBURGER, J. - The development of a molecular approach for coprodiagnosis of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasit.*, 146: 214-220, 2007.
20. SCHARLES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D. *et al.* - Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int. J. Parasit.*, 35: 1525-1537, 2005.
21. SHEATHER, A.L. - The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J. comp. Path. Therap.*, 36: 266-275, 1923.

Received: 4 December 2007

Accepted: 7 April 2008

Toxoplasma gondii Pneumonia in Immunocompetent Subjects: Case Report and Review

Fabio Eudes Leal,¹ Cinthya Luzia Cavazzana,¹
Heitor Franco de Andrade, Jr.,² Andrés Jimenez Galisteo, Jr.,³
João Silva de Mendonça,¹ and Esper Georges Kallas^{1,2}

¹Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, ²Federal University of São Paulo, ³Instituto de Medicina Tropical São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Pulmonary toxoplasmosis is rare in immunocompetent subjects. Here, we describe a 41-year-old previously healthy male patient who presented to the emergency department of a hospital with a life-threatening case of pneumonia due to *Toxoplasma gondii* infection, which responded to specific therapy. Clinical and image-based findings overlap with those for atypical pneumonias, and toxoplasmosis should be considered in the differential diagnosis—especially if immunoglobulin M-specific antibodies are detected.

Infection of humans with *Toxoplasma gondii* is common worldwide, with the prevalence varying according to environment, eating habits, and age [1]. Contact with this obligate intracellular protozoan may occur through direct ingestion of food or water contaminated with cat feces containing oocysts, ingestion of tissue cysts in uncooked meat, transplacental infection of the fetus, WBC transfusion, or organ transplantation. Disease may occur through acute infection after recent contact with *T. gondii* cysts or oocysts or through endogenous reactivation. In Brazil, data obtained from a blood bank [2] showed a higher prevalence of *T. gondii* infection among male patients (79.0%) than among female patients (63.4%) and an age-dependent seroprevalence that reached 92.6% in the 40–50-year age group. In another study that involved 2126 pregnant women in southern Brazil [3], 74.5% of subjects had specific antibodies to *T. gondii*.

The typical clinical presentation of acute *T. gondii* infection

includes prolonged fever, headache, lymph node enlargement, and, occasionally, myalgia and gastrointestinal symptoms. Hepatomegaly and hepatitis with a moderate increase in aminotransferase levels (a 5–10-fold elevation) are common. One of the laboratory hallmarks of toxoplasmosis is lymphocytosis and the presence of atypical lymphocytes. Serological confirmation in typical clinical presentations is often sufficient for a diagnosis to be made, although isolation of the organism remains the diagnostic gold standard. However, atypical clinical features may occur even in immunocompetent subjects, raising the importance of parasitological confirmation for accurate diagnosis. Pulmonary involvement is frequently described in immunosuppressed patients [4], but acute toxoplasmosis only rarely results in clinical pulmonary involvement in immunocompetent hosts (in whom it usually manifests as atypical pneumonia [5]).

Here, we report a case of an immunocompetent man with an acute *T. gondii* infection that was confirmed by parasite isolation who developed a severe pulmonary involvement. This rather unusual clinical presentation is rarely reported, and we review the published cases of acute *T. gondii* infection with parasitological confirmation in previously healthy persons.

Case report. A 41-year-old man was admitted to the emergency department of the Hospital do Servidor Público Estadual (São Paulo, Brazil) on 24 September 2005 with an 8-day history of fever, myalgia, and headache followed by 4 days of nausea and vomiting. He reported consumption of semiraw beef 20 days before developing symptoms. Although he denied a history of contact with sewage or flood water, he reported the presence of rats in his dwelling area. The patient reported no comorbidities or use of any medication prior to the presentation of symptoms.

A physical examination revealed fever (temperature, 40°C), jaundice (1 on a scale of 4), hepatosplenomegaly, and tachycardia (heart rate, 115 beats per min) but no lymph node enlargement. Hematological blood tests revealed a total WBC count of 2700 cells/mm³ (53% neutrophils and 43.2% lymphocytes with presence of atypical cells), a hemoglobin level of 11.6 g/dL, and a normal platelet count. Blood chemistry revealed hepatitis (aspartate aminotransferase level, 269 U/L; alanine aminotransferase level, 312 U/L), mild hyperbilirubinemia (total bilirubins, 2.32 mg/dL), and elevated lactic deshydrogenase (755 U/L). Findings of an examination of a urine sample were unremarkable.

Thirty six hours after admission to the hospital, the patient developed respiratory insufficiency with bilateral pulmonary reticular opacities suggestive of interstitial infiltrate (figure 1)

Received 19 September 2006; accepted 12 December 2006; electronically published 8 February 2007.

Reprints or correspondence: Dr. Esper Georges Kallas, Federal University of São Paulo, Rua Mirassol 207, 04044-010, São Paulo, SP, Brazil (kallas.dmed@epm.br).

Clinical Infectious Diseases 2007;44:e62–e66

© 2007 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

1058-4838/2007/4406-00E2\$15.00

DOI: 10.1086/511871

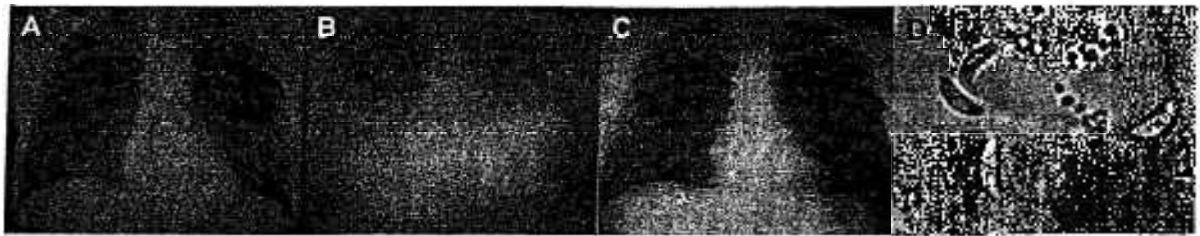


Figure 1. Sequential radiographs of the thorax showing mild bilateral interstitial infiltrate at the patient's admission to the hospital (24 September 2005; A), marked heterogeneous bilateral opacity 4 days later (28 September 2005; B), and regression of lung involvement at a follow-up visit (26 October 2005; C). D, Phase-contrast microscopy of peritoneal washing samples obtained from mice 15 days after their injection with peripheral blood Ficoll-Hypaque purified buffy coat cells from the patient, revealing typical extracellular live tachyzoites (original magnification, $\times 1000$).

and an arterial partial pressure of oxygen of 44.6 mmHg. He received intravenous penicillin, ceftriaxone, and clarithromycin, as well as noninvasive respiratory support. Serologic testing revealed the presence of *T. gondii*-specific IgM antibodies by ELISA. An HIV-1 antibody test had negative results. Blood cultures did not reveal any pathogen growth. An immunological analysis revealed 435 CD4⁺ T cells/ μ L and 1601 CD8⁺ T cells/ μ L (CD4⁺:CD8⁺ T cell ratio, 0.27), and immunoglobulin fractions were as follows: IgG, 1656 mg/dL; IgM, 1169 mg/dL; and IgA, 525 mg/dL. Treatment for acute *T. gondii* infection was initiated with sulfadiazine, pyrimethamine, corticosteroids, and folinic acid.

In the following 3 days, the patient's respiratory insufficiency worsened, which was associated with a profound decrease in hemoglobin level (from 11.6 g/dL to 6.6 g/dL within 6 days) but without evidence of blood loss or hemolysis. He showed a marked improvement in clinical, radiological, and laboratory findings after the fourth day of therapy for *T. gondii*, and he was discharged from the hospital 12 days after admission. Toxoplasmosis treatment was maintained for 30 days.

Samples of blood, CSF, and sputum were assayed for *T. gondii* DNA after alkali extraction using PCR with B1 gene primers [6]. Despite normal cytological and chemistry findings, PCR revealed a typical 115-base pair product in the CSF sample. Parasite isolation was also attempted using peripheral blood Ficoll-Hypaque purified buffy coat cells injected intraperitoneally in Balb/C mice, equivalent to 0.5 mL of blood per mouse. After 15 days of infection, analysis of peritoneal washing fluid samples of 2 of the 4 mice revealed typical tachyzoites, as shown in figure 1D. These washing samples were reinjected into the mice and suggested a type III strain infection [7].

During the follow-up period, the patient experienced continued fever and myalgia that resolved 8 days after he was discharged from the hospital. Lymphocyte counts revealed 681 CD4⁺ T cells/ μ L and 921 CD8⁺ T cells/ μ L (CD4⁺:CD8⁺ T cell ratio, 0.74) after 1 month and 830 CD4⁺ T cells/ μ L and 1383 CD8⁺ T cells/ μ L (CD4⁺:CD8⁺ T cell ratio, 0.60) after 1 year of follow-up. Immunoglobulin fractions returned to normal val-

ues after 1 year (IgG, 1513 mg/dL; IgM, 87 mg/dL; and IgA, 202 mg/dL).

Discussion. *T. gondii* can invade every nucleated cell in the body, although the preferred target organs are the lymph nodes, brain, heart, and lungs. Proliferation of tachyzoites results in the infection of neighboring cells and necrosis, which can be associated with an intense mononuclear cell reaction [8]. In immunocompetent subjects, the infection is usually asymptomatic. In the CNS and in the eye, 2 immune privileged sites where antibody and complement levels are low [9, 10], ongoing tachyzoite destruction can occur, although resolution of infection has occurred in other tissues. After the period necessary for mononuclear cell activation and development of a specific immune response in an immunocompetent host, the infection is generally controlled, and tissue cysts are formed. Stably replicating tachyzoites are present in these cysts and may reactivate in the event of an immune deficiency.

As is true with a number of intracellular protozoan infections, IFN- γ is considered to be central in the generation of macrophages with antimicrobial activity that are responsible for parasitic control [11–13]; however, recent reports have described IFN- γ -independent pathways of immunological antimicrobial activity using TNF- α [14], CD40-CD154 signaling [15, 16], or IL-12 [17]. Many other defense mechanisms, such as nitric oxide generation, specific antibody production, and oxygen-dependent defense pathways, are essential, along with cellular activation, to control the parasite in its proliferative stage [8]. In vivo data reveal that reactive nitrogen intermediates are important for antimicrobial activity against intracellular pathogens [18], and nitric oxide synthase 2 is essential for *T. gondii* control in chronic-phase infection models [19].

Patients with AIDS have been shown to have a defect in the ability of T lymphocytes to produce appropriate antigen-specific IFN- γ [20], despite high circulating levels of total serum IFN- γ [21]. This production is inhibited in cases in which *T. gondii* is found in the lung (e.g., in patients with AIDS and in transplant recipients) [8]. This phenomenon is reflected by the high frequency of pulmonary involvement in HIV-infected sub-

Table 1. Reported cases with detection of *Toxoplasma gondii* in clinical specimens.

Patient	Study	Year	Age, years (sex)	Country	Main clinical and laboratory findings	Consumption of raw or undercooked meat	Toxoplasmosis serological findings	Imaging findings	Parasitological diagnosis	Outcome
1	Pinkerton et al. [25]	1941	43 (F)	United States	Fever, rash	NR	NR	Pulmonary congestion	Necropsy: intracellular <i>T. gondii</i> in alveoli and bronchioles	Death
2	Pinkerton et al. [25]	1941	50 (M)	United States	Fever, weakness, cough, dyspnea	NR	NR	Irregular areas of increased density	Necropsy: intracellular <i>T. gondii</i> in spleen and lungs	Death
3	Amann-Hart et al. [26]	1965	28 (M)	Spain	Fever, cough, headache, fatigue	NR	NR	BL interstitial infiltrates	Isolation of <i>T. gondii</i> during autopsy from lungs, heart, and CNS	Death
4	Candolfi et al. [5]	1993	33 (F)	France	Fever, cough, dyspnea	NR	IgM positive and IgG positive	BL reticulonodular opacities	BAL fluid sample inoculated onto MRC-5 tissue cultures	Full recovery
5	Carde et al. [24]	1998	35 (M)	French Guyana	Fever, myalgia, elevated liver enzymes	No	IgM positive and IgG positive	BL pulmonary infiltrates	<i>T. gondii</i> trophozoites detected in BAL	Full recovery
6	Carne et al. [22]	2002	17 (M)	French Guyana	Fever, ELELs, pneumonia	No	IgM positive and IgG positive	BL alveolar infiltrates	Blood inoculation in mice and <i>T. gondii</i> isolation postinoculation	Full recovery
7	Carne et al. [22]	2002	22 (M)	French Guyana	Fever, ELELs, pneumonia	Yes	IgM positive and IgG positive	BL interstitial infiltrates	Blood inoculation in mice and <i>T. gondii</i> isolation postinoculation	Full recovery
8	Carne et al. [22]	2002	40 (M)	French Guyana	Fever, ELELs, pneumonia	No	IgM positive and IgG positive	BL interstitial infiltrates	Blood inoculation in mice and <i>T. gondii</i> isolation postinoculation	Full recovery
9	De Salvadori et al. [23]	2005	11 (M)	France	Fever, cough, dyspnea, ELELs	NR	IgM positive and IgG positive	BL interstitial infiltrates	Flow cytometry and PCR on BAL fluid samples	Full recovery
10	Present case	2005	41 (M)	Brazil	Fever, fatigue, dyspnea	Yes	IgM positive and IgG positive	BL reticulonodular opacities	<i>T. gondii</i> tachyzoites in mouse peritoneal washing sample after injection with patient's peripheral blood Ficol-Hypaque purified buffy coat cells	Full recovery

NOTE. BAL, bronchoalveolar lavage; BL, bilateral; ELEL, elevated liver enzyme level; NR, not reported.

jects with low CD4⁺ T cell counts who live in certain geographic areas. In a French study of pulmonary involvement in the pre-HAART era, a significant proportion of patients with AIDS received a diagnosis of *T. gondii* pneumonia [4].

Conversely, lung involvement associated with *T. gondii* infection is rather rare in immunocompetent subjects. We were able to identify only 9 cases of *T. gondii* pneumonia with parasitic confirmation in the medical literature. Table 1 summarizes the epidemiological, clinical, and diagnostic data from previous reports and from the present case. Although more cases have been published recently, *T. gondii* pneumonia has been recognized since the 1940s. Most patients were young men (male sex, 80%; median age, 34 years; interquartile range, 23.5–40.7 years). A common epidemiological feature, as suggested by several other cases with serological diagnosis and no parasite isolation, was the consumption of raw or undercooked meat (game)—a common practice in developing countries [22].

In addition to the respiratory clinical presentation, all patients had fever, and many reported nonspecific associated symptoms, such as myalgia, weakness, and rash. Elevated liver enzyme levels and imaging findings, mostly reflecting interstitial lung involvement, were often described. Since the 1990s, all patients have been positive for IgG and IgM *T. gondii*-specific antibodies. A parasitological diagnosis was made on the basis of tachyzoite isolation in bronchoalveolar lavage fluid, during mouse inoculation, or during necropsy. The outcome has dramatically changed from that of the 3 initially reported cases; all patients with cases reported in the last 2 decades experienced full recovery. This may be a consequence of the improvement in intensive care—in particular, the improvement in respiratory support.

No particular predisposing factors for *T. gondii* lung involvement in immunocompetent subjects have been described. It is possible, because of the very limited number of reported cases, that these individuals were infected with a high parasite burden or that they acquired the infection through a different route, such as inhalation (as has been suggested by others [23]). However, no case series or reports have established such an association. To date, no parasite strain has been shown to have specific pulmonary tropism, but there are some suggestions that South American strains—especially those from the Amazon—could be more virulent or aggressive, leading to severe disseminated disease [23, 24].

Clinical and image-based findings associated with pulmonary toxoplasmosis mimic those associated with many other atypical pneumonias, and pulmonary toxoplasmosis should be considered as a differential diagnosis; a risk of *T. gondii* infection from raw or undercooked meat consumption or other potential exposure must be investigated. Once suspected, a diagnosis of toxoplasmosis must be pursued through testing for serum IgM-specific antibodies and, ideally, through further investigation

of biological samples (especially sputum samples) by cytological analysis, PCR, or bioassays for *T. gondii*. Specific antimicrobial therapy must be instituted in the advent of high suspicion because of the potentially life-threatening course of the disease and the potential for a complete recovery.

Acknowledgments

We thank Dr. Marina Tsukumo and Dr. Douglas F. Nixon for scientific advice. We also thank Dr. Kioko Takei and Leandro Martos for laboratory support.

Financial support. F.E.L. and C.L.C. have been supported by Fundação de Desenvolvimento Administrativo scholarships. This work was partially supported by Laboratório de Investigação Médica—Hospital das Clínicas—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

References

1. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Vol. 2. Philadelphia, PA: Elsevier Health Science, 2005.
2. Coelho RA, Kobayashi M, Carvalho LB Jr. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003;45:229–31.
3. Spalding SM, Amendoeira MR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38:173–7.
4. Tourani JM, Israel-Biet D, Venet A, Andrieu JM. Unusual pulmonary infection in a puzzling presentation of AIDS. *Lancet* 1985;1:989.
5. Candolfi E, de Blay F, Rey D, et al. A parasitologically proven case of *Toxoplasma pneumonia* in an immunocompetent pregnant woman. *J Infect* 1993;26:79–81.
6. Hohlfield P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994;331:695–9.
7. Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 2005;21:476–81.
8. Evans TG, Schwartzman JD. Pulmonary toxoplasmosis. *Semin Respir Infect* 1991;6:51–7.
9. Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 2003;3:879–89.
10. Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:917–24.
11. Murray HW. Interferon- γ , the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann Intern Med* 1988;108:595–608.
12. Andrade RM, Portillo JA, Wessendarp M, Subauste CS. CD40 signaling in macrophages induces activity against an intracellular pathogen independently of gamma interferon and reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 2005;73:3115–23.
13. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73:209–12.
14. Yap GS, Scharon-Kersten T, Charest H, Sher A. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J Immunol* 1998;160:1340–5.
15. Andrade RM, Wessendarp M, Subauste CS. CD154 activates macrophage antimicrobial activity in the absence of IFN- γ through a TNF- α -dependent mechanism. *J Immunol* 2003;171:6750–6.
16. Subauste CS, Wessendarp M. CD40 restrains in vivo growth of *Toxoplasma gondii* independently of gamma interferon. *Infect Immun* 2006;74:1573–9.
17. Khan IA, Matsuura T, Fonseka S, Kasper LH. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice. *J Immunol* 1996;156:636–43.

18. Murray HW, Juangbhanich CW, Nathan CF, Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J Exp Med* 1979; 150:950-64.
19. Scharon-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 1997; 185: 1261-73.
20. Murray HW, Rubin BY, Masur H, Roberts RB. Impaired production of lymphokines and immune (γ) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984; 310:883-9.
21. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, et al. Interferon- γ concentrations are increased in sera from individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989; 2: 158-62.
22. Carne B, Bissuel F, Ajzenberg D, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4037-44.
23. De Salvador-Guillouet F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, et al. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. *J Infect* 2006; 53:e47-50.
24. Darde ML, Villena I, Pinon JM, Beguinot I. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. *J Clin Microbiol* 1998; 36:324.
25. Pinkerton H, Henderson RG. Adult toxoplasmosis: a previously unrecognized disease entity simulating the typhus-spotted fever group. *JAMA* 1941; 116:807-14.
26. Amato Neto V. A fatal case of interstitial pneumonia due to toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1969; 11:377-81.

***Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs**

L. R. Meireles^{1,2}, A. J. Galisteo Jr¹, E. Pompeu³ and H. F. Andrade Jr¹

¹ Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

² Depto. Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP, Brazil

³ Centro de Bioterrorismo, São Paulo, SP, Brazil

Summary

Infection by the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii* is widely prevalent in humans and animals throughout the world. Transmission takes place mainly by ingestion of raw or undercooked meat that contains parasite cysts or by ingestion of oocysts excreted in cat faeces, which can contaminate water and raw vegetables. The incidence of toxoplasmosis in urban areas can thus be also related to environmental contamination with oocysts. A direct measure of this environmental contamination by oocyst counting is unfeasible for technical reasons. An interesting alternative for measuring *T. gondii* urban spreading is the seroprevalence in free-living urban animals, used as sentinels, once they are exposed to similar risks of *Toxoplasma* infection-like humans. With this aim, we tested serum samples from stray cats and dogs for antibodies to *T. gondii* by indirect haemagglutination assay (IHA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Antibodies to *T. gondii* were found in 40% (40 of 100) of the cats, less than the 50.5% (101 of 200) found in dogs by ELISA ($P < 0.05$). Haemagglutination showed low resolution and concordance, precluding their use for diagnosis of *T. gondii* infection compared with ELISA. The prevalence of *T. gondii* was lower among stray cats probably due to their selective alimentary habits and lower water and food intake. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in stray dogs and cats could be an indirect indicator of the parasite spreading in urban areas.

keywords *Toxoplasma gondii*, cats, dogs, indirect haemagglutination, enzyme-linked immunosorbent assay

Introduction

Toxoplasmosis, a widespread zoonosis caused by the obligatory intracellular coccidian protozoan *Toxoplasma gondii*, is generally benign or associated with mild non-specific clinical symptoms in most patients (Krick & Remington 1978). However, this agent is responsible for visual losses in at least 1% of the infected individuals, with deaths and great morbidity in fetuses (Remington *et al.* 1995) and immunocompromised patients (Passos *et al.* 2000).

The agent is transmitted mainly by ingestion of oocysts excreted in faeces of infected cats or by meat from intermediate hosts containing cysts. This infection has been demonstrated in domestic livestock, wild life and other animals including dogs and cats in most areas of the world (Tenter *et al.* 2000). Felids are the only animal group that has an enteric sexual cycle with excretion of environmentally resistant oocysts in faeces during 1–3 weeks after primary infection, highly infective to intermediate hosts (Lindsay *et al.* 1997). After 1–5 days

maturation, those forms can survive for months to years under favourable environmental conditions and are remarkably resistant to most disinfectants (Dubey & Beattie 1988). Because of irregular and limited oocyst shedding, the main approach available for infection ratio in cats is through seroprevalence (Dubey 1994). Although the presence of oocysts is usually low, rare, occasional and difficult to be found in water and soil (Isaac-Renton *et al.* 1998) they play an important role in human infection, as they are resistant to usual water treatment with chlorination and decantation (Dubey & Beattie 1988). Furthermore, urban water supply comes from distant unprotected areas, allowing toxoplasmosis outbreaks because of oocyst contamination of the drinking water as described elsewhere (Eng *et al.* 1999).

Free-living animals such as stray cats and dogs could be used as sentinels of environmental spreading with *T. gondii* in densely built urban areas, since they are exposed without any protection to all the infective forms of the parasite. Furthermore, ground-feeding animals such as chickens that would likely become infected via oocysts as sentinels of soil

contamination with *T. gondii* were not available in urban areas.

Stray cats and dogs might be the best available sentinels for such studies in urban areas because they are usually captured by Public Health services for control of rabies. To support this rationale, we used recently reported seroprevalence tables (Tenter *et al.* 2000) to analyse human, dog and cat seroprevalence values from similar countries and within one decade. Interestingly, we found that the prevalence of toxoplasmosis among humans correlates with *T. gondii* seroprevalence in those two animal species, with similar and high R^2 -values for dogs and cats, although the latter could be incriminated as a contamination source.

Living in the same environment, dogs and humans are similarly exposed to *T. gondii* contamination and despite their different hygienic behaviours, canine toxoplasmosis might be an important epidemiological indicator of the risk of toxoplasmosis to man. The level of *Toxoplasma* infection in cats and dogs in the State of São Paulo, where human contact with these animals is frequent, might be an indirect measure of environmental contamination, helping to understand the epidemiology of toxoplasmosis, which is highly prevalent in this Brazilian State (Guimaraes *et al.* 1993). In view of these considerations, we standardized an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for anti-*T. gondii* IgG in cats and dogs. Serum samples were assayed with both ELISA and a commercial haemagglutination assay in order to test the seroprevalence of feline and canine toxoplasmosis as an indicator of parasite spreading.

Materials and methods

Samples were collected during 1999–2000 from 100 stray cats housed at International Union of Protection to the Animals (IUPA) and 200 stray dogs captured by the Zoonosis Control Centre (ZCC) from São Paulo metropolitan area. Blood was collected by vein puncture under anaesthesia, according to the Brazilian College of Animal Experimentation. Serum was separated from the clot by centrifugation at 1000 g for 10 min, mixed (1:1, v/v) with phosphate-buffered glycerol (pH 7.2) and stored at -20°C until use.

Toxoplasma gondii antigen was prepared from infected mouse peritoneal fluid as described elsewhere (Camargo *et al.* 1978), except for one step of mammalian cell exclusion by adhesion to sterile pre-packed Sephadex G50 5 ml column. The preparation was adjusted to 1 mg protein/ml and stored at -70°C until use as antigen in the ELISA.

The commercial kit HAP Toxoplasmosis (Salck®) was used according to manufacturer's instructions. Briefly,

serum samples were inactivated for 30 min at 56°C , diluted 1:16 and disposed on 96-multiwell V bottom plates (25 μl /well) after addition of 25 μl of a 1% suspension of red blood cells sensitized with *T. gondii* antigens. The plates were homogenized and incubated for 1 h in a humid chamber. The test was considered positive when a layer of agglutinated erythrocytes covered more than 50% of the bottom of the V-shaped well, and negative when a small dot (<10%) of non-agglutinated erythrocytes was formed in the well centre.

The ELISA was performed as described elsewhere (Venkatesan & Wakelin 1993). Briefly, ELISA microplates (multiwell plate/polystyrene; Sigma®) were coated with 100 μl /well of a solution containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the antigen extract diluted in 0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5, and incubated overnight at 4°C . The plates were then washed five times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.02% Tween 20 (PBS-T), and blocked for 1 h at 37°C with PBS containing 2% fat-free dry milk. After this step, 100 μl of serum samples, diluted 1:100 in PBS-T, was added to each well and the plate was incubated for 1 h at 37°C . After additional washing with PBS-T, 100 μl of species-specific peroxidase conjugate, appropriately diluted with PBS-T, was added to the wells, with incubation for 1 h at 37°C followed by five washings with PBS-T. The reactions were developed with 100 μl /well of OPD solution (1 mg/ml *o*-phenylenediamine and 0.03% H_2O_2 in 0.2 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0). The reaction was stopped with 50 μl /well of 4 N HCl and the optical density (OD) at 492 nm was measured in a microplate reader (Labsystems Multiskan MS). Each plate contained positive control sera obtained from experimentally infected animals as well as negative control sera, which had been previously determined by indirect immunofluorescence assay (IFA), performed as described elsewhere (Camargo *et al.* 1978).

Frequencies were compared by testing binomial proportions and tests were compared by Kappa test and serological indexes using the EPIINFO 6.01 (CDC, Atlanta, USA) statistical package, and were considered significant when $P < 0.05$, with estimation of the 95% confidence interval of most measures.

Results

The toxoplasmosis seroprevalence of stray cats and dogs was initially evaluated by indirect haemagglutination assay (IHA) using a commercial reagent as described in Materials and Methods. The results obtained revealed 17% of prevalence among cats and 38% among dogs, but some sera showed unreliable lower reproducibility inter assays.

We standardized an ELISA for specific anti-*T. gondii* IgG detection in cat and dog serum samples, using

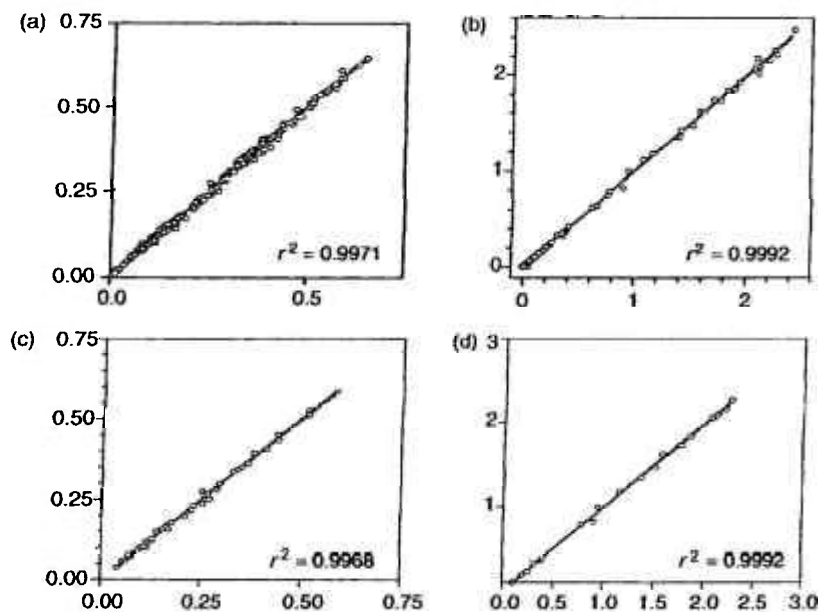


Figure 1 Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for dog (a, c) and cat (b, d) immunoglobulin G (IgG) against *Toxoplasma gondii*, expressed as ELISA optical density with Pearson correlation (r^2) between assays, (a) and (b) show variation of intra-test reproduction for test performed in the same plate; c and d show variation of inter-test reproduction for test performed at different days.

standard positive and negative sera previously confirmed by IFA. Those standards allowed the determination of optimal antigen-coating, conjugate dilution and plate uniformity of the immunosorbent assay and these conditions were then applied to all the subsequent tests. The ELISA data presented high reproducibility and extremely low variation, as could be seen in Figure 1, where intra- and inter-test variations was analysed. In all tests, the variability range was extremely low, with correlation over 0.99 for both quality control tests. The high reproducibility of the ELISA results using standard sera previously characterized by IFA allowed us to use such data as golden standard for the determination of relative serological IHA indexes. These are presented in Table 1 and show the low sensitivity and high number of false negative results obtained with the haemagglutination method, especially in cat serum.

The ELISA results for individual samples of both species could be seen in Figure 2. The antibodies levels in positive cats were higher than those found in dogs, but in both cases positive sera were clearly defined and revealed similar *T. gondii* seroprevalences, namely 40% (95% CI: 30.74–49.82%) for cats and 50.5% (95% CI: 43.58–57.39%) for dogs, slightly higher ($P < 0.05$) than cats.

The relative frequencies of positive sera obtained with ELISA and IHA for dogs and cats were compared in Figure 3. The Kappa test was used for this comparison and showed no agreement between tests for both dog ($P < 0.05$) and cat samples ($P < 0.01$).

Discussion and conclusions

Indirect haemagglutination assay showed low sensitivity and concordance for evaluating *T. gondii* antibodies in sera of stray cats and dogs, especially in cats, precluding their use for diagnosis of *T. gondii* infection if compared with ELISA. This low sensitivity may be accounted for by several factors, like cross-reactivity with chicken red blood cells used as biological support in the assay (Suarez-Aranda *et al.* 2000), or low antibodies levels in samples. We suggest that despite the advantageous low cost of IHA, its single test should not be used in epidemiological surveys of toxoplasmosis until more reliable reagents are available and their interpretation must be cautious as we demonstrate with our findings.

Our standardization of ELISA for cat and dog sera provided sensitive tests with high reproducibility, allowing the detection of more reliable data on *T. gondii* seroprevalence compared with IHA and revealing higher values in both species. We detected significant levels of *Toxoplasma* antibodies in 40% of the 100 cat sera tested with our ELISA. Similar ELISA values for *T. gondii* seroprevalence were reported worldwide, as in Sweden, where 42% of seropositive cats were found (Uggla *et al.* 1990); Australia, where 39% domestic cats were reported positive (Summer & Ackland 1999) and Germany, with reported infection rates from 32% in kept cats to 55% in stray cats (Tenter *et al.* 1994). Other laboratory tests showed similar values as 61.3% of positive cats in Czech Republic, by IFA

Table 1 Relative sensitivity, relative specificity, number of false positive and false negative results with indirect haemagglutination assay (IHA) for serological detection of *Toxoplasma gondii* infection among dogs and cats

IHA × ELISA	Animal (%)	
	Cat	Dog
Relative sensitivity (<i>n</i>)	40 (16/40)	51.50 (52/101)
95% CI	25.3–56.6	41.4–61.5
Percentage false negative (<i>n</i>)	60 (24/40)	48.50 (49/101)
Relative specificity (<i>n</i>)	98.30 (59/60)	75.80 (75/99)
95% CI	89.9–99.9	65.9–83.6
Percentage false positive (<i>n</i>)	1.7 (1/60)	24.2 (24/99)

For the comparisons, ELISA was used as gold standard.

IHA, indirect haemagglutination assay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

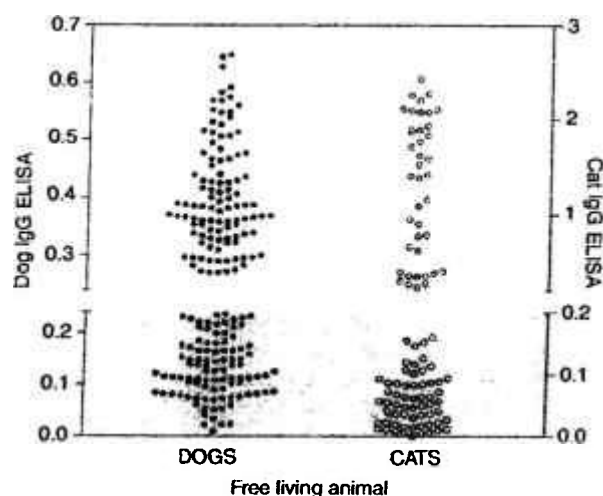


Figure 2 Distribution of individual optical density (OD) in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Toxoplasma gondii* immunoglobulin (Ig)G of urban stray or free-living dogs and cats. The vertical axis was cut at 99% confidence interval (CI) of each species, negative reaction. Dog samples are expressed as empty circles and cat samples as open circles.

(Svobodova *et al.* 1998), whereas the latex agglutination test (LAT) showed 33.33% positive cats in Bangladesh (Samad *et al.* 1997). On the contrary, a serological survey with LAT in Japan detected *T. gondii* antibodies in 6% of domiciled cats (Nogami *et al.* 1998); interestingly, the similar prevalence was also found among Japanese humans, indicating that feline seroprevalence could be related to the dissemination of toxoplasmosis in this country. In Brazil, the frequency observed in our feline

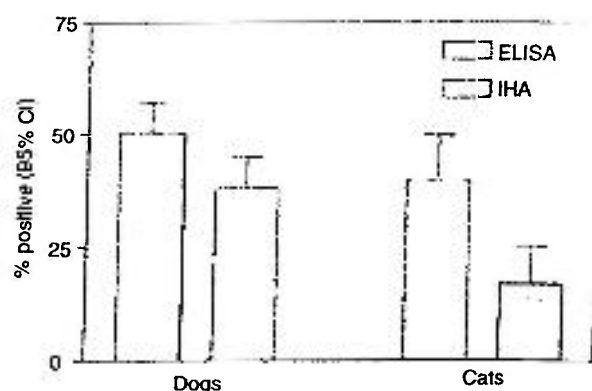


Figure 3 Reactive cat and dog sera defined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (open bar) and indirect haemagglutination assay (IHA, shaded bar). Bars represent the 95% confidence interval of the measure.

population by ELISA was similar to previously described 45% of positive cats in São Paulo, using the Sabin-Feldman test (Sogorb *et al.* 1972). However, lower frequency was detected among domestic outpatient cats in São Paulo (17.7%; 44 of 248) by IFA. Diet and access to the outdoor environment were suggested as important factors for cat infection (Lucas *et al.* 1999). A recent study conducted in São Paulo metropolitan region showed a seroprevalence of 26.3% (132 of 502) by modified agglutination test using a larger and heterogeneous population sample, which included both stray and domiciled cats (Silva *et al.* 2002). Domiciled cats with free access to the outdoor environment have the opportunity to hunt for small preys, thus becoming more susceptible to infection by *T. gondii* than cats exclusively kept indoors (Robertson 1998). Our data refers to stray cats and must be cautiously extrapolated to other Brazilian cat groups. This is particularly relevant as the introduction in the Brazilian market of commercial cat food used only by domestic cats, because heating above 66 °C kills *Toxoplasma* in meat (Dubey 1994) and the high temperatures (>100 °C) applied to industrialized cat food eliminate viable tissue cysts. Stray cats must survive from food found in domestic garbage, usually similar food that was prepared for human consumption, despite an occasional hunt. The only available preys are small birds, as pigeons and sparrows, or rodents that live in the sewage system, but the strong *Rattus norvegicus* could be considered a difficult prey for cats and garbage food is more available than birds in urban areas.

Our ELISA detected *Toxoplasma* antibodies in 50.5% (101 of 200) of the dog sera tested. This frequency differs from others described in the literature, using several tests. In Sweden, there is one report of 23% (70 of 303) of

positive dogs by ELISA (Uggla *et al.* 1990) while by LAT, 32% (80 of 250) of positive dogs were found in Trinidad & Tobago (Ali *et al.* 2003). In Brazil, most studies mention prevalence values similar to our findings, with 35% (14 of 40) positive dogs by ELISA in Minas Gerais State (Silva *et al.* 1997) and 63.8% (30 of 47) positive dogs in city of Botucatu, São Paulo State, using IFA (Salata *et al.* 1985), both conducted near to our studied region. In our study, a high proportion of stray dogs was found to be infected with *T. gondii*, reflecting the high transmission rates in the studied areas, especially if we consider the short lifespan of dogs when compared with humans. Seroprevalence in stray dogs could serve as an alternative for estimating the spreading of *Toxoplasma* in epidemiological studies, since dogs are exposed to all transmission forms of the parasite in water, food and other environmental sources, opposed to pets that are usually fed with industrialized food. Stray dogs were also exposed to the same conditions as stray cats, but they are usually less effective hunters for living preys than cats, feeding mostly on human garbage. *Toxoplasma gondii* prevalence was higher among stray dogs than among cats, probably due to differences in alimentary habits, as cats are normally more selective, drink less water and eat smaller amounts of food; this reduced ingestion implies lower exposure.

In urban areas, usually densely built-up, there are few preys for cats and dogs, and their main source of *Toxoplasma* contamination with cysts are leftovers of meat for human consumption, available in garbage. Those meats are produced in distant farms, with usual sanitary control for most diseases, but not for toxoplasmosis. The other main source, oocysts in water, is easily available for those animals, both in treated water delivered during exterior house washings or garden watering or contamination of any water source with faeces from infected urban cats. Stray cats and dogs are relatively scarce animals, because of active zoonosis control, but they ingest similar food and water as humans, without hygiene habits or water filtration, and are therefore fully exposed to the risk of *Toxoplasma* infection.

In conclusion, the serological assays used in our study provide adequate information on the prevalence of *T. gondii* infection among stray cats and dogs, which can be used to estimate the spreading of this agent and allow timely intervention for the control of infection.

Acknowledgements

Authors thank the International Union of Protection to the Animals (IUPA), São Paulo, for allowing us to collect samples from their housed cats and the skilled technical assistance of Roselaine P. A. Cardoso. This work was a

part of the post-graduation in Parasitology of L. R. Meireles, supported by a fellowship from FAPESP (98/13323-0). A. J. Galisteo Jr was a FAPESP undergraduate fellow (98/01681-0). This work was partially supported by grants from FAPESP (99-04926-6) and LIMHCFMUSP-49.

References

- Ali CN, Harris JA, Watkins JD & Adesiyun AA (2003) Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Veterinary Parasitology* 113, 179-187.
- Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK & Nakahara OS (1978) Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined serological patterns. *Infection and Immunity* 21, 55-58.
- Dubey JP (1994) Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 205, 1593-1598.
- Dubey JP & Beattie CP (1988) *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Boca Raton, Flórida, 220 pp.
- Eng SB, Werker DH, King AS *et al.* (1999) Computer-generated dot maps as an epidemiologic tool: investigating an outbreak of toxoplasmosis. *Emergency Infectious Diseases* 5, 815-819.
- Guimaraes AC, Kawarabayashi M, Borges MM, Tolezano JE & Andrade HF Jr (1993) Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 35, 479-483.
- Isaac-Renton J, Bowie WR, King A *et al.* (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2278-2280.
- Krick JA & Remington JS (1978) Toxoplasmosis in the adult - an overview. *New England Journal of Medicine* 298, 550-553.
- Lindsay DS, Blagburn BL & Dubey JP (1997) Feline toxoplasmosis and importance of the *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 104, 448-461.
- Lucas SR, Hagiwara MK, Loureiro V, Ikasaki JY & Birgel EH (1999) *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic out-patient cats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 41, 221-224.
- Nogami S, Moritomo T, Kamata H *et al.* (1998) Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* in domiciled cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 60, 1001-1004.
- Passos LN, Araújo Filho OF & Andrade HF Jr (2000) *Toxoplasma* encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42, 141-145.
- Remington JS, McLeod R & Desmonts G (1995) Toxoplasmosis. In: *Infectious Diseases of the Fetus Newborn Infant*, 4th edn. (eds JS Remington & JO Klein). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 140-267.
- Robertson ID (1998) Survey of predation by domestic cats. *Australian Veterinary Journal* 76, 551-554.
- Salata E, Yoshida EL, Pereira EA & Correa FM (1985) Toxoplasmoses em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27, 20-22.

- Samad MA, Dey BC, Chowdhury NS, Akhtar S & Khan MR (1997) Sero-epidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infection and animals in Bangladesh. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 28, 339–343.
- Silva DA, Cabral DD, Bernardina BL, Souza MA & Mineo JR (1997) Detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immuno-fluorescent and haemagglutination titers. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 785–789.
- Silva JC, Gennari SM, Ragozo AM *et al.* (2002) Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology* 88, 419–420.
- Sogorb F, Jamra LF, Guimarães EC & Deane MP (1972) Toxoplasmosse espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 14, 314–320.
- Suarez-Aranda F, Galisteo AJ, Hiramoto RM *et al.* (2000) The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Veterinary Parasitology* 91, 23–32.
- Summer B & Ackland ML (1999) *Toxoplasma gondii* antibody in domestic cats in Melbourne. *Australian Veterinary Journal* 77, 447–449.
- Svobodova V, Knotek Z & Svododa M (1998) Prevalence of IgG and IgM antibodies specific to *Toxoplasma gondii* in cats. *Veterinary Parasitology* 80, 173–176.
- Tenter AM, Vietmeyer C, Johnson AM *et al.* (1994) ELISAs based on recombinant antigens for seroepidemiology studies on *Toxoplasma gondii* infections in cats. *Parasitology* 109, 29–36.
- Tenter AM, Heckeroth AR & Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217–1258.
- Uggla A, Mattson S & Juntti N (1990) Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 31, 219–222.
- Venkatesan P & Wakelin D (1993) ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitology Today* 9, 228–232.

Authors

Luciana Regina Meireles, Andrés Jimenez Galisteo Jr, Heitor Franco de Andrade Jr (corresponding author), Laboratório de Protozoologia IMTSP/USP e Depto. de Parasitologia ICB/USP, Av. Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 470 05403-000 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30667010; Fax: +55 11 30885237; E-mail: lrmeirel@usp.br; galisteo@usp.br; hfandrad@usp.br
Eduardo Pompeu, Centro de Bioterismo FMUSP, Av. Dr Arnaldo 455 CEP 01243-000 São Paulo, SP, Brazil.
E-mail: epompeu@biot.fm.usp.br

HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF C57Bl/6j AND BALB/c MICE IMMUNIZED WITH IRRADIATED TACHYZOITES OF *Toxoplasma gondii* RH STRAIN AND ORAL CHALLENGE WITH ME-49 STRAIN

**Andrés Jimenez Galisteo Jr.^{1,2}, Nahiara Esteves Zorgi², Janaína Baptista Alves¹,
Roberto Mitsuyoshi Hiramoto³, Nanci do Nascimento¹ and Heitor Franco de Andrade
Jr.²**

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN)
Centro de Biotecnologia
Av. Professor Lineu Prestes, 2242
05508-000 São Paulo, SP
galisteo@usp.br

² Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP / USP)
Laboratório de Protozoologia
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
05403-000 São Paulo, SP

³ Instituto Adolfo Lutz

ABSTRACT

Toxoplasmosis, a prevalent widespread infection in man and animals, is mainly transmitted by oral route, through ingestion of oocysts from water and food contaminated with cat feces or infected animal tissue cysts in undercooked meat. Vaccine development implies in effective intestinal immunity, the first site of parasite entry. Radiation (255Gy/⁶⁰Co) sterilized *T. gondii* RH strain tachyzoites (RST) induced significant protection when parentally administered, similar to chronically infected and acute disease protected animal. We study the humoral immune response in C57Bl/6j and BALB/c mice immunized with 10⁷ RST, by oral (with aluminium hydroxide 3%) or parenteral 3 biweekly administrations. *T. gondii* antigens specific ELISA for IgG, IgA, IgG1, IgG2a and IgG2b detection was performed in weekly blood samples during immunization. Also we evaluate of the intestinal epithelial of immunized mice the integrity of the radiated parasites by electronic microscopy. After 2 weeks, immunized and control animals were challenged with 10 cysts of ME-49 strain p.o. Protection was determined at the 30th day by brain cyst counting. As it was possible to observe in the intestinal mucosal, the aluminium hydroxide seems to maintain unchanged the parasite morphology and its mechanisms of invasion, probably due to keeping it safe from extreme pH condition of stomach. All immunized groups presented significant protection when challenged with ME-49; however, BALB/c mice showed better protection levels, with only one positive animal on brain microscopic analysis. IgG production in the serum of the animals was higher in groups immunized by i.p route, however, IgA and IgG1 levels were higher in BALB/c mice immunized by oral route. This higher protection found in BALB/c group could probably also be related to the Th2 response, demonstrated by higher IgG1 levels. All these data provide insights in oral immunization schedules for toxoplasmosis prevention, suggesting that oral vaccines could be an alternative in the prevention of toxoplasmosis and the block of chain transmission.

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an apicomplexan protozoan, which can cause abortion or congenital birth defects in humans. Toxoplasmosis can cause severe disease in fetus of pregnant acutely infected woman, immunocompromized (AIDS) and therapeutically immune suppressed patients, as cancer or transplant recipients. The infection is acquired by ingestion of water and

food contaminated with oocysts of feline feces or raw meat contaminated with tissue cysts [1]. Once ingested, the cysts wall is digested within the lumen of the small intestine, and then the parasite infects the epithelial cells from which it is disseminated to other organs throughout the host, in particular, muscle and the central nervous system [2]. To date no human vaccine has been development, with some vaccines developed for veterinary use, but with low efficiency [3]. Several models of vaccines were developed in mice, using different antigens and routes, with conflicting results. *T. gondii* irradiated tachyzoites (RH*) inoculated by intra peritoneal route induced protection, with immune response similar to the chronically infected mice, with resistance to challenge [4]. In this work, we used irradiated parasites in the study of the intestinal immunity, which is the main infection way of infection by *T. gondii*, either for the felines as definitive hosts, or the intermediate hosts, the mammals and birds, including the man, analyzing the immune response and protection, key steps for the vaccine production.

2. MATERIALS AND METHODS

All reagents and conjugates were purchased from commercial sources, mainly of Sigma Co (St. Louis) and solutions were prepared with high quality water (Milli-Q®).

2.1. Parasites and animals:

Two strains of *T. gondii*, RH and ME-49, cryopreserved and maintained by successive passage in mice (Protozoology Lab., Tropical Medicine Institute of São Paulo). RH strain was maintained routinely by intraperitoneal (i.p.) passage in outbred mice. ME-49 strain was kindly donated by Prof. Dr. Fausto Araújo, UCLA, and was also kept serial passage in C57Bl/6j or Swiss mice-oral gavage. C57Bl/6J and BALB/c mice, were obtained from our colony (Centro de Bioterismo/FMUSP), and maintained in sterilized cages and absorbent media, with commercial food (Nuvital®) and water "ad libitum". The management of these animals before or during the experiments was according of "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH Publication no 86-23, revised 1996) and the "Principles of Ethics in Animal Experimentation" (COBEA-Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

2.2. Irradiation and immunization:

The tachyzoites suspensions of *T. gondii* (RH strain), maintained in ice-cold baths, were irradiated at 255Gy (RH*), in uniform source of ⁶⁰Co γ-rays (GAMMACELL™, Atomic Energy of Canada, Ltd.), in the presence of oxygen and dose rate of 6,41 kGy/h [5]. Groups of 5 mice were immunized with 1, 2 and 3 doses of 10⁷ irradiated tachyzoites (i.p or v.o), suspended in aluminum hydroxide 3% suspension as antacid or a mix 1:1 of both vehicles, and immediately administered by oral gavage for each individual mouse. Blood samples was collected from tail of the mice in standardized filter papers that absorbs 5ul of blood, dried at room temperature and stored -20°C until use. Antibodies were recovered by extraction with 100µl PBS for 18h a 4°C. All samples collected were stored at -20°C until use [5].

2.3. *Toxoplasma gondii* antigen preparation and ELISA for antibody detection in serum:

Tachyzoites of the RH strain were harvested from mice peritoneal cavity of previously infected mice in phosphate buffered saline (PBS), recovered by centrifugation, washed, counted and submitted to sonication (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA) for several periods of 4 cycles/30 seconds in an ice bath, until all parasites were destroyed, by phase contrast microscopy. The solution was isotonized by 0,3M NaCl addition (v/v) and

cleared by centrifugation at 10000g for 3min. The protein content of the supernatant was determined and aliquots were maintained at -70°C. The wells were coated overnight at 4°C with 100µl of carbonate buffer pH 9.6-0,1M containing 10µg of antigen of *T. gondii*. After three washes with PBS-0,05% Tween 20, remaining binding sites were blocked for 1h at 37°C with 200µl of PBS + Milk 3%. After washing, 100µl of the serum of mice were added and plates were incubated for 1h at 37°C. After washing above, 100µl per well of anti-mouse IgA and IgG peroxidase conjugate (Sigma®). After washing, the reaction was revealed by the addition of 100µl OPD (o-phenylenediamine 1mg/ml) for 30 min. at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by 50µl per well of 4N HCl solution. The reading was done spectrophotometrically (Labsystems Multiskan MS®) at 492nm [6]. For IgG subclasses, serum dilutions, 100µl, were added to each well and the plates were incubated for 1h at 37°C. After additional washing with PBS-T, bound IgG were detected by incubation for 1h with peroxidase-conjugated anti-mouse anti-IgG1, anti-IgG2a and anti-IgG2b (Southern Biotechnology Associates®) at 37°C, followed by 5 washings with PBS-Tween. The bound conjugate were developed with 100µl per well of OPD (o-phenylenediamine 1mg/ml) by 30 min., stopped with 100µl per well of citric acid 0,2M, and the absorbance read at 450nm in an ELISA reader (Dynatech MR4000®).

2.4. Challenge of immunized mice:

Tissue cysts of *T. gondii* ME-49 strain were obtained from the brains of chronically infected C57Bl/6j. Brains were homogenized in 30% dextran in Hanks's balanced salt solution (HBSS). This mixture was centrifuged at 3000g for 10min. at 4°C and the pellet was re-suspended in HBSS. Tissue cysts were counted at optical microscope. The immunized mice were challenged after 15 days from the last dose with 10 cysts by oral route. The controls with normal mice were challenged with the same quantity of cyst. The mortality of the animals was followed daily. After 30 days, all mice were killed and the estimation of number of cysts/brain [7].

2.5. Eletron microscopy:

The intestinal sections of immunized mice were fixed in 1.5% glutaraldehyde solution buffered with 0.08M cacodylate buffer (pH 7,4). After 1h on ice the organ was centrifuged (1000g, 5min) and re-suspended in 1% osmium tetroxide. After 1h on ice, with occasional mixing, the samples had been processed for embedding in Araldite® [8]. Ultra-thin sections were contrasted stained with uranyl acetate, observed and micrographed in a Zeiss™ EM109 electron microscope.

3. RESULTS

Serum IgG and IgA production was detected by ELISA in different mice strains. Serum IgG production was higher in all i.p. immunized groups, showing an expressive increasing with the subsequent inoculations, as observed in Fig. 1A. When serum IgA response was evaluated in the same groups, was observed that the response was increased in oral route immunized group after the first inoculation, whereas in subsequent inoculations was noticed a low increased response in i.p. group, with similar response profiles in both groups (Fig. 1B). Considering C57Bl/6j mice, serum IgA response showed a higher humoral response development after the second oral route inoculation, what did not happen with BALB/c mice, which presented more efficient response when animals were oral route immunized, with a profile compared to i.p. group (Fig. 1D).

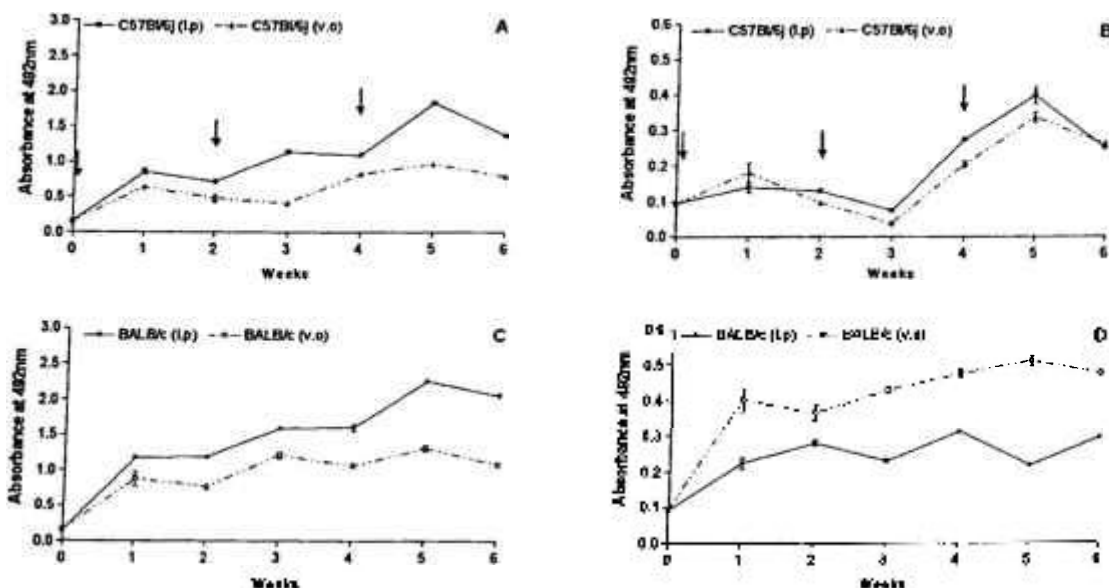


Figure 1. Specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG(A/C) and IgA(B/D) antibody in C57BL/6j and BALB/c mice serum immunized with 3 doses (i.p. or v.o.) with 10^7 tachyzoites RH strain, 255 Gy irradiated with aluminum hydroxide (oral route), detected by ELISA. Days of immunization procedures are indicated by black arrows.

The levels of IgG subclasses were analyzed by ELISA to determine the proportion produced in the immunized groups with irradiated tachyzoites, using different strains of mice. The BALB/c mice immunized i.p. presented the higher level both in IgG1 and IgG2a subclasses. The C57BL/6j mice (i.p.) presented an increase in the level of IgG2b subclasses. In oral immunization the BALB/c mice showed an increase in the levels of IgG1 and IgG2b subclasses (Fig. 2).

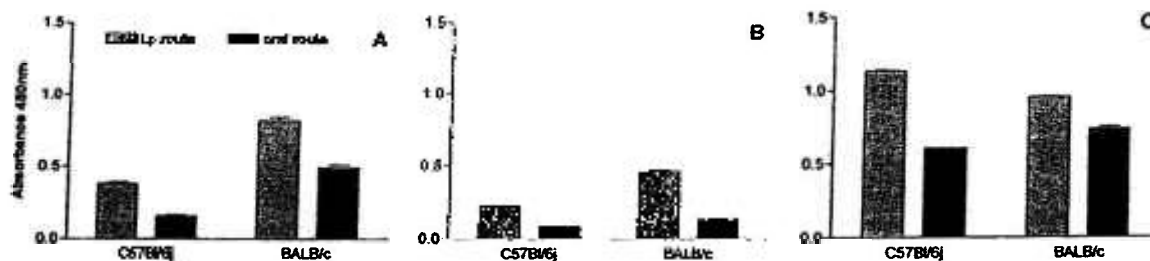


Figure 2. Evaluation of IgG subclasses, IgG1(A), IgG2a(B) and IgG2b(C), produced in C57BL/6j and BALB/c mice in response to immunization (3 doses), with irradiated tachyzoites of *T. gondii*, in different routes.

Different protection levels were determined among mice strains, which were immunized with 255Gy irradiated tachyzoites by oral and i.p. routes. In C57BL/6j group we observed death rates of 40% in oral route immunized animals one week after challenging. In both immunized groups, we could notice over 50% protection when compared to control group and similar protection levels between the groups, as observed in Fig. 3A. BALB/c mice showed higher protection levels, which were over 90%, cysts were observed in only one animal of each immunized group, as observed in Fig. 3B.

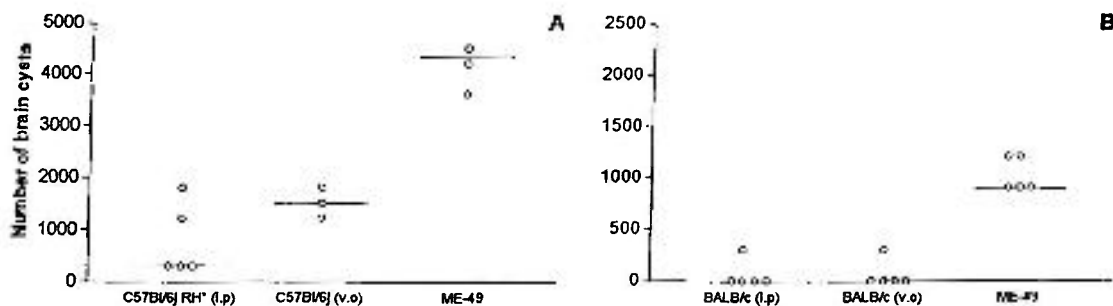


Figure 3. Number of brain cysts, after 30 days from oral challenge with 10 cysts of ME-49 strain, in mice immunized with different routes. C57Bl/6j mice (A) and BALB/c mice (B).

For study of the integrity of the vaccine preparation when passing through the gastrointestinal tract, evaluation by electronic microscopy was performed, as described in methods. In this assay we can notice that the administration of irradiated parasites, by oral route, didn't cause inflammation or necrosis of tissues the intestinal mucosa. The integrity of the microvilli and the enterocytes was observed during all evaluated period. As we can observe in the Fig. 4A, after 30 minutes of immunization with radiated tachyzoites, we notice that these already had penetrated in the intestinal epithelium and after 4h and 30 minutes the presence of early parasitophorous vacuoles was observed around the parasites, as can be observed in the Fig. 4B. These data suggest that the parasites were kept intact and viable during the transit for the digestive treatment, not suffering alteration for the action from any condition of digestive tract.



Figure 4. Electron microscopic of the intestinal section in C57Bl/6j mice, after oral immunization with irradiated tachyzoites (255Gy). (A) 30 minutes and (B) 4h and 30 minutes, after oral inoculation. Arrows indicate T. gondii parasites in intestinal epithelium.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Serum IgG levels detected in different mice strains immunized with 255Gy-irradiated tachyzoites were present but lower in oral route immunized animals, as compared to parenteral challenged animals. These events had been already detected in C57Bl/6j mice when oral route immunized with irradiated tachyzoites [5]. Exposition to antigens on gut can induce humoral response, but with lower intensity if compared to parenteral route, as elsewhere described [9], specially related to IgG production. Serum IgA levels were produced by BALB/c mice challenged by oral route, with levels present since the first inoculation in oral route immunized animals. IgA was the main immunoglobulin for mucosal secretion and our data suggest that also serum IgA has an important role as one of the host defense lines against *T. gondii*. It is well known that serum IgA plays an important role in bacterial infections in blood, avoiding septicemia and disease [10]. In addition, immunization with *Giardia duodenalis* rCWP2 recombinant protein showed that serum IgG was very important on inhibition of cyst releasing, and then reducing disease transmission [11]. Serum levels of specific IgA could indirectly reflects the presence of this immunoglobulin in mucosal sites and luminal secretion, and could an alternative index for luminal protection.

The IgG subclasses results showed similar levels of production of each group of animals, but, as expected, parenteral-vaccinated mice presented the higher level of subclasses. When oral route of vaccination was analyzed, the production of IgG subclasses was present but smaller, but the differences were related only to the intensity of production, with the same subclass proportions.

When different immunized animal groups were challenged with cysts of ME-49 *T. gondii* strain, all groups presented partial protection if compared to control group. In all vaccination schemes, response was close to those we had already found by using C57Bl/6j mice, when i.p. or oral route immunized. However, BALB/c mice presented higher protection levels (over 95%) after challenged with cystogenic ME-49 strain. This higher protection in BALB/c is related to the higher levels of antibody induced by oral challenge, which could indirectly represents a shift to an Th2 immune response, under influence of higher IL-4 production than in C57Bl/6j mice, which similar response was more discrete, as well as lower serum antibody levels [12]. This fact must be carefully investigated, probably looking for cytokine in situ production or circulating levels, which have been reported as a specific role in of different immunization schedules groups, in order to evaluate the response and specific schedule which provides better efficiency against parasites when oral route immunization is applied.

Using electron microscopy, we could observe preservation of the parasites through the digestive tract probably due both to the use of the aluminum hydroxide used as vehicle for gastric juice protection but also the characteristic of parasitic membrane structure, which allows the detection of maintenance of viability signs as cell invasion and penetration, keeping all the conditions so that the tachyzoites are active and preserved, but without reproductive capacity, resulting in subsequent reproductive death [4]. This fact was also indirectly proven by the achieved serum and intestinal antibody produced for the mice oral immunized [5]. This data clearly show the arrival and cell invasion of irradiated tachyzoites by oral route, however, the success of the oral immunization imply in an effective presentation of antigens in for immune response induction in the intestinal mucosa (Peyer's patches and intestinal epithelium) [13], acting as mediator of communication between the lumen and the mucosal immune system.

All this data show the possibility of development of an oral vaccine to toxoplasmosis, which much more feasibility than parenteral ones. This vaccine could be useful in an attractive-bait form that could be spread in the environment to protect the free living cats, promoting a

decrease in excretion of oocysts by cats and reducing the environment transmission of toxoplasmosis, in an approach ecologically correct, without the risks of direct intervention in the human populations.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful thanks to Cleusa F. H. Takakura for excellent electron microscopy expertise, Roselaine P. A. Cardoso for help in laboratory preparations and Eng. Carlos G. da Silveira and Eng. Elizabeth S. R. Somessari from IPEN to technical assistance during irradiation. The student Galisteo Jr., A.J. is a fellow of CNPq (141404/2004-3). This work was supported by CNPq and LIMHCFMUSP-49.

REFERENCES

- 1 – Montoya, J.G. & Liesenfeld, O. "Toxoplasmosis", *Lancet*, **363**, pp.1965-1976 (2004).
- 2 – Sukthana, Y., "Toxoplasmosis: beyond animal to humans", *Trends Parasitol.*, **22**(3), pp.137-142 (2006).
- 3 – Buxton, D., "Toxoplasmosis: the first commercial vaccine". *Parasitol. Today*, **9**(9): 335-337 (1993).
- 4 – Hiramoto, R.M., Galisteo Jr., A.J., do Nascimento, N. & Andrade Jr., H.F., "200Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice", *Vaccine*, **20**(16), 2072-2081 (2002).
- 5 – Galisteo Jr., A.J., Hiramoto, R.M., Carmo, C.V., Alves, J.B., Andrade Jr., H.F., "255Gy irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* induce intestinal immune response in C57Bl/6j mice immunized by oral route". The International Nuclear Atlantic Conference (INAC 2005) (2005).
- 6 – Venkatesan, P. & Wakelin, D. "Elisas for parasitologists: or lies, damned lies and Elisas", *Parasitology Today*, **9**(6), 228-232 (1993).
- 7 – Booth, K.S., James, E.R. & Popiel, I. "Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*". *Cryobiology*, **33**, 330-337 (1996).
- 8 – Duarte, M.I., Mariano, O.N., Takakura, C.F., Everson, D. & Corbett, C.E. "A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease", *Ultrastruct Pathol.*, **16**(4), 475-482 (1992).
- 9 – Ogra, P.L. & Mestecky, H., *Handbook of Mucosal Immunology*, 1^a ed., Academic Press, San Diego, 766p. (1994).
- 10 – Van Egmond, M., Damen, C.A., Van Spruiel, A.B., Vidarsson, G., Van Garderen, E. & Van de Winkel, J.G., "IgA and the IgA Fc receptor", *Trends Immunol.*, **22**(4), 205-211 (2001).
- 11 – Larocque, R., Nakagaki, K., Lee, P., Abdul-Wahid, A. & Faubert, G.M., "Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts", *Infect Immun.*, **71**(10), 5662-5669 (2003).
- 12 – Hsieh, C., Macatonia, S.E., O'Garra, A. & Murphy, K.M., "T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*", *J. Exp. Med.*, **181**(2), 713-721 (1995).
- 13 – Cripps, A.W., Kyd, J.M., Foxwell, A.R. "Vaccines and mucosal immunization", *Vaccine*, **19**(17-19), 2513-2515 (2001).

STRUCTURE ALTERATION AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF ^{60}Co GAMMA RAYS IRRADIATED BOTHROPSTOXIN-I

Janaina A Baptista¹, Daniel Perez Vieira^{1,2}, Andrés Jimenez Galisteo Júnior^{1,2}, Camila Myiagui Yonamine¹, Priscila Caproni¹, Murilo Casare¹, Heitor Franco de Andrade Júnior^{1,2}, Patrick Jack Spencer¹ and Nanci do Nascimento¹

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)

Av. Professor Lineu Prestes 2242

05508-000 São Paulo, SP

janabap@gmail.com

² Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Lab. de Protozoologia

ABSTRACT

About 20000 ophidic accidents are registered every year in Brazil. Serum therapy with equine antisera is the only efficient treatment. The venoms employed for immunization are fairly toxic and some venoms present low immunogenicity. Thus, the obtention of modified antigens with lower toxicity and preserved or improved immunogenicity would be useful. These toxins, when submitted to gamma radiation, in aqueous solution, present structural modifications. This occurs due to reactions with the radiolysis products of water. Some scavenger substances, such as NaNO_3 and t-butanol, remove selectively the water radiolysis products. Ionizing radiation has proven to be a powerful tool to attenuate snake venoms toxicity without affecting and even increasing their immunogenic properties. However, the immune mechanisms involved in recognition, processing and presentation of irradiated antigens are yet unclear. In the present work, we investigated the immunological behavior of bothropstoxin-I (Bthx-I), before and after irradiation, in the presence of selective scavengers. Isogenic mice were immunized with either the native or the irradiated toxin, either with or without scavengers. After three immunizations, serum samples were collected and the antibody titers and isotypes were determined by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. The antigenic characterization of native and irradiated bothropstoxin-I was performed by Western blot. The detection of expression of murine cytokines (IFN- γ e IL-10) was analyzed by RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction). According to our data, irradiation process has promoted structural modifications in the toxin, characterized by higher molecular weight forms of the protein (aggregates and oligomers). Our data also indicate that irradiated toxins, alone or in the presence of NaNO_3 , an aqueous electron scavenger, were immunogenic and the antibodies elicited by them were able to recognize the native toxin. On the other hand, when the toxin was irradiated in presence of t-butanol, a discrete reduction in antibodies levels was observed, suggesting a role of hydroxyl radicals in the modulation of immune response. Irradiated bothropstoxin-I elicited antibodies responsive to both toxins forms, as demonstrated by Western blot. The cytokines profiles indicated that IFN- γ mRNA presence appeared to be higher for mice immunized with irradiated toxin, while IL-10 mRNA presence was predominant with the antigen in its native form. These results indicate that irradiation of proteins leads to significant structural modifications, and also to a modulation of the immunological response.

1. INTRODUCTION

Ionizing radiation consists of electromagnetic waves resulting from nuclear transitions. It can interact with biomolecules in two ways: directly, when the radiation hits the molecule, or indirectly when free radicals are generated and react with the target molecule. With proteins, radiation promotes changes in their enzymatic, pharmacological and immunological properties; the two latter being more radioresistant [1,2,3].

The obtention of modified antigens with lower toxicity and preserved or improved immunogenicity would be useful. Snake venoms or its toxins, when submitted to gamma radiation, in aqueous solution, present structural modifications. This occurs due to reactions with the radiolysis products of water. Some scavenger substances, such as NaNO_3 and t-butanol, remove selectively the water radiolysis products [4,5].

However, the immune mechanisms involved in recognition, processing and presentation of irradiated antigens are yet unclear. In the present work, we investigated the immunological behavior of bothropstoxin-I (Bthx-1), before and after irradiation, in the presence of selective scavengers.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents

All reagents were commercially obtained and were of analytical grade. Bothropstoxin-1 was purified from *Bothrops jararacussu* crude venom (Butantan Institute).

2.2 Animals

B10.PL isogenic mice were obtained from the animal housing facility of IPEN/CNEN/SP and maintained in sterilized isolators and absorbent media, with food and water *ad libitum*. The manipulation of these animals before or during the experiments was according to the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publ. N° 86-23, revised in 1985) and to the "Principles of Ethics in Animal Experimentation" (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

2.3 Protein irradiation

Bothropstoxin-I was dissolved in 0,15 M NaCl to a final concentration of 2mg/mL. This solution was irradiated with a 2 kGy dose using gamma rays derived from a ^{60}Co source (Gamma Cell, Atomic Agency of Canada Ltd) at room temperature and in the presence of atmospheric O_2 , with a 2,88 kGy/h dose rate.

2.4 SDS-PAGE

Purified bothropstoxin-1, native or irradiated one, were submitted to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE) [6] under reducing and not-reducing conditions.

2.5 Production of antibodies

Specific anti-native or anti-irradiated bothropstoxin-1 antibodies were obtained by immunizing B10.PL mice, with the protein in its native or irradiated form, following a classical immunization protocol [7]. Blood samples were collected and after centrifugation, the plasma was separated and frozen.

2.6 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

96 wells microplates were coated with native bothropstoxin-1 (1,0µg/well/100µl) overnight. The plates were then blocked with 5% skim milk in phosphate buffered saline (PBS). The plasma samples were then incubated for one hour after a 1/20000 or 1/40000 dilution in PBS. Peroxydase labeled antibodies specific against mouse IgG1, IgG2a or IgG2b were then allow to react individually with the bound antibodies. Finally, the reaction was developed adding a chromogenic solution containing 0.5 mg/ml orto phenyl diamine in 50 mM citrate buffer pH 5 in the presence of 1µl/ml hydrogen peroxide. After 20 minutes incubation, the reaction was interrupted by the addition of 50 µl 2 M citric acid and the plates were analyzed on a microplate reader at 450 nm.

2.7 Western Blot

SDS-PAGE samples were transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane, followed by blockade of membrane free binding sites with 5,0% milk in phosphate buffer (PBS), pH 7,2, over nighth. Specific anti-BTHX-1, native or irradiated, mouse IgG was added over nighth, at 4°C with constant shaking. After washing, peroxidase anti-mouse IgG conjugate was applied. The reaction was developed by the addition of a chromogenic solution (3,3'-diamino-benzidine; H₂O₂; pH 7,2) and then stopped by repeated washing with distilled water.

2.8 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Sample collection, RNA extraction and RT-PCR: Reverse transcription, amplification and detection of products

Spleens cells of immunized and control mice (BALB/c and B10.PL) were aseptically removed and immersed immediately in ten volumes of TriZOL™ (Invitrogen), and stored at -80°C until the moment of total RNA extraction. The total RNA extraction from samples was performed according to the manufacturer recommendations. mRNA chains present in RNA samples supplied convenient templates to cDNA synthesis, in reactions catalyzed by M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) in presence of Oligo d(T)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen). The libraries obtained by this method were tested against presence or absence of IL-10 expression using specific primers in PCR reactions (Sense: CTCAGTTCCTTCTATTATTCAC; Antisense: GGATCTCCCTGGTTTCTCTTC; T_a= 62,1°C; 336 bp) and IFN-γ expression (Sense: GTCCAGCGCCAAGCATTCAA; Antisense: GTCCCCCACCCCCAGATACA; T_a= 71,6°C; 391 bp). For control of the reaction we used a 349 bp fragment corresponding to β-actin expression (Sense: TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC; Antisense:

TAAACGCAGCACAGTAACAGTCCG, $T_a=55,6^\circ\text{C}$). Amplified sequences were resolved in silver-stained polyacrilamide gels (6% / 60V).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 showed that irradiated toxins, alone or in the presence of NaNO_3 and t-butanol, an aqueous electron scavenger, was immunogenic and the antibodies elicited by them were able to recognize the native toxin. Similar fact was observed by CASARE (2003) when worked with the crotamina (subunit of *Crotalus durissus terrificus* venom).

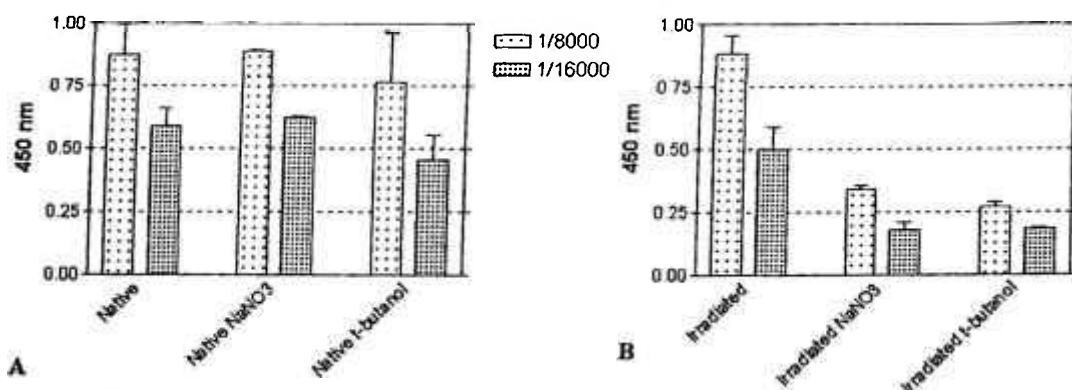


Figure 1 - Enzyme Linked Immunosorbent Assay of the antibodies rose against native (A) and irradiated (B) BTHX-1 samples, with or without scavengers substances.

In Western blot (Figure 2) was demonstrated that irradiated bothropstoxin-1 elicited antibodies responsive to both toxins forms. CARD and cols. (1998) observed the same fact when worked with crotoxin (toxin of *Crotalus durissus terrificus* venom).

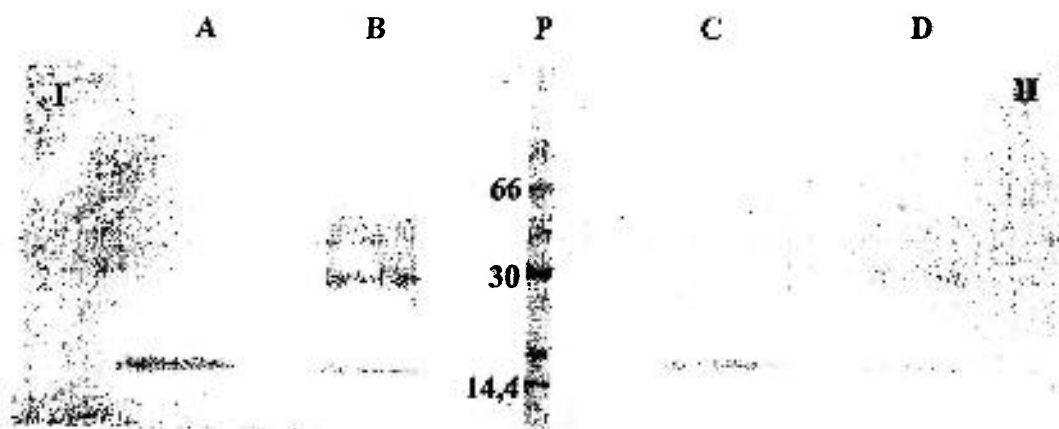


Figure 2 - Western blot assay, using BTHX-1 Native (A,C) e Irradiated (B,D), in reduction conditions. Mouse anti-BTHX-1 Irradiated (I) or anti-BTHX-1 Native (II) was employed as primary antibody.

Figure 3 showed that cytokines profiles indicated that IFN- γ and IL10 mRNA presence appeared as much in the animals immunized with the native toxin as well as in those immunized with the irradiated toxin. These results were obtained with the cells of the immunized animals. Our results indicate that irradiation of proteins leads to significant structural modifications but the irradiated toxin, alone or in the presence of scavengers substances, were able to stimulate the immune system and the resulting antibodies were able to react with the native form of them.

	B10.PL (N)	B10.PL (I)	BALB/c (N)	BALB/c (I)	Control
IL-10					
INF- γ					
β -actin					

Figure 3 – Digital imaging records of IL10, INF- γ and β -actin RT-PCR from spleen cells, from the B10.PL and BALB/c mice, immunized with native protein (N) and irradiated protein (I). The control was a non immunized animal.

4. CONCLUSIONS

BTHX-1 irradiated, alone or in the presence of scavengers substances, an aqueous electron scavenger, was immunogenic and the antibodies elicited by them were able to recognize the native toxin.

The Western Blotting assay has indicated that the antibodies formed against the irradiated BTHX-1 present highly response for both forms of toxin.

Irradiation of proteins promotes both significant structural modifications and an immunological response modulation.

Although RT-PCR data showed differences between IFN- γ expression in studied groups, further evaluation of expression of another cytokines and experiments using *in vitro* antigen stimulated spleen cells may resolve remaining questions about immune response polarization.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNPq from Brazil.

REFERENCES

1. GROSH, DS & HOOPYWOOD, LE, *Biological effects of radiation*, 2nd ed., New York, Academic Press, (1979).
2. BUTLER, J; HOEY, BM & SWALLOW, AJ, Radiation chemistry. *Annu.Rep.Prog.Chem.*, **83**:129-175, (1987).
3. GARRISON, WM, Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem.Rev.*, **87**:381-398, (1987).
4. CASARE, MS, (2003), Influência das principais espécies reativas formadas durante o processo de destoxicação de toxinas por radiação ionizante. 73p. (Dissertação de Mestrado – IPEN – CNEN/SP).
5. HAWKINS, AL & DAVIES, MJ, (2001), Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1504**:196-219.
6. LAEMMLI, UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685, (1970).
7. HARLOW, E & LANE, D, *Antibodies. A Laboratory Manual*. Ed. Cold Sprig Harbor Lab, NY, (1988).
8. CARDI, BA, Avaliação do mecanismo de captação e endocitose de crotoxina submetida à ação da radiação gama, por macrófagos peritoniais de camundongos. São Paulo, 97p. (Tese de Doutorado-IPEN- CNEN/SP), (1999).

255Gy IRRADIATED TACHYZOITES OF *Toxoplasma gondii* INDUCE INTESTINAL IMMUNE RESPONSE IN C57BL/6J MICE IMMUNIZED BY ORAL ROUTE

Andrés Jimenez Galisteo Jr.^{1,2}, Roberto Mitsuyoshi Hiramoto³, Cláudia Villano do
Carmo², Janaína Baptista Alves¹ and Heitor Franco de Andrade Jr.²

1 - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Laboratório de Biologia Molecular - Av. Professor Lineu Prestes, 2242
05508-000 São Paulo, SP
galisteo@usp.br

2 - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP / USP - SP)
Laboratório de Protozoologia - Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
05403-000 São Paulo, SP
hfandrad@usp.br

3 - Instituto Adolfo Lutz (IAL - SP)
Seção de Parasitoses Sistêmicas - Av. Dr. Arnaldo, 351 - 8º andar
01246-902 São Paulo, SP
hiramoto@usp.br

ABSTRACT

Toxoplasmosis, a prevalent widespread infection in man and animals, occurs mainly through ingestion of water and food contaminated with oocyst from cat feces, causing usually benign disease in humans, except in intrauterine fetal infection or in immunodeficient patients. We study the oral route for the development of a vaccine for toxoplasmosis, using parasites irradiated with 60 Cobalt, as an alternative for vaccine development to this worldwide parasitic infection. We evaluated the development of immunity at serum or mucosal levels, and their efficiency in protect the mice against challenge with oral cysts of the ME-49 strain. C57Bl/6j isogenic mice were immunized by oral route with 10^7 255 Gy irradiated tachyzoites from RH strain, at several protocols using milk as anti-peptic adjuvant and alum hydroxide as antacid. The preparations of irradiated tachyzoites induced production of serum IgG and IgA in immunized mice, as determined by ELISA, with IgG2a as the dominant subclass, similar to chronic infection. Their use with adjuvant allowed the excretion of significant amounts of IgA in stools also IgG, despite a lesser extent. All oral preparations induced some quantitative protection against challenge, which was similar to the parenteral route only isolated alum hydroxide was used as adjuvant. All these data support the possibility of the development of an oral vaccine against toxoplasmosis, using irradiated tachyzoites, which would be possible tool in near future for use in field baits, for immunizing either domestic or wild felids.

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an apicomplexan protozoan, which can cause abortion or congenital birth defects in humans. Infection is usually asymptomatic in man with normal immune function, with occasional eye involvement [1]. Toxoplasmosis can cause severe disease in fetus of pregnant acutely infected woman, immunocompromized (AIDS) and therapeutically immune suppressed patients, as cancer or transplant recipients [2]. The infection is acquired by ingestion of water and food contaminated with oocysts of feline feces or raw meat contaminated with tissue cysts [3]. Once ingested, the cysts wall is digested within the lumen of the small intestine, and then the parasite infects the epithelial cells from which it is disseminated to other organs throughout the host, in particular, muscle and the central

nervous system [4]. To date no vaccine has been commercialized in the field of human parasitology, with some vaccines developed for veterinary use, but with low efficiency [5]. Several models were developed in mice, using different antigens and routes, all of them with conflicting results [6].

T. gondii irradiated tachyzoites inoculated by intra peritoneal route induced protection, with immune response similar to the chronically infected mice, with resistance to challenge [7]. In this work, we used irradiated parasites in the study of the intestinal immunity, which is the main infection way of infection by *T. gondii*, either for the felines as definitive hosts, or the intermediate hosts, the mammals and birds, including the man, analyzing both the immune response and protection, key steps for the vaccine production.

2. MATERIALS AND METHODS

All reagents and conjugates were purchased from Sigma Co (St. Louis) and solutions were prepared with high quality water (Milli-Q®).

2.1. Parasites and animals

Two strains of *T. gondii*, RH and ME-49, cryopreserved and maintained by successive passage in mice (Protozoology Lab., Tropical Medicine Institute of São Paulo) were used in this study. RH strain was maintained routinely by intraperitoneal (i.p.) passage in outbred mice. ME-49 strain was kindly donated by Prof. Dr. Fausto Araújo, UCLA, and was also kept serial passage in C57Bl/6j mice-oral gavage. Isogenic C57Bl/6J mice, were obtained from our colony (Centro de Bioterismo/FMUSP), and maintained in sterilized cages and absorbent media, with commercial food (Nuvital®) and water “*ad libitum*”. The management of these animals before or during the experiments was according of “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH Publication n° 86-23, revised 1996) and the “Principles of Ethics in Animal Experimentation” (COBEA-Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

2.2. Irradiation and immunization

The tachyzoites suspensions of *T. gondii* (RH strain), maintained in ice-cold baths, were irradiated at 255Gy (TX), in uniform source of ⁶⁰Co γ-rays (GAMMACELL™, Atomic Energy of Canada, Ltd.), in the presence of oxygen and dose rate of 6,41 kGy/h. The group control was maintained outside the source and after irradiation, the viability of samples was determined by Trypan Blue exclusion, being used only those with >95% viable parasites [7]. Groups of 5 mice were immunized with 1, 2 and 3 doses of 10⁷ irradiated tachyzoites, suspended in pure defatted bovine milk, as anti-peptic solution or in aluminum hydroxide 3% suspension as antacid or a mix 1:1 of both vehicles, and immediately administered by oral gavage for each individual mouse. Blood samples were collected from tail of the mice in standardized filter papers that absorb 5ul of blood, dried at room temperature and stored -20°C until use. Antibodies were recovered by extraction with 100µl PBS for 18h at 4°C. The soluble extract was recovered by centrifugation and considered a 1/20 dilution of blood. Fecal samples were collected from groups of mice, at the three days intervals. The suspension, extracted with PBS, was vortexed and centrifuged for 15min. at 13000g [8]. All samples collected were stored at -20°C until use.

2.3. *Toxoplasma gondii* antigen preparation and ELISA for antibody detection in serum and intestinal secretions

Tachyzoites of the RH strain were harvested from mice peritoneal cavity of previously infected mice in phosphate buffered saline (PBS), recovered by centrifugation, washed, counted and submitted to sonication (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA) for several periods of 4 cycles/30 seconds in an ice bath, until all parasites were destroyed, by phase contrast microscopy. The solution was isotonized by 0,3M NaCl addition (v/v) and cleared by centrifugation at 10000g for 3min. The protein content of the supernatant was determined [9] and aliquots were maintained at -70°C [10]. Enzyme immunoassays were performed in 96 well microtration plates. The wells were coated overnight at 4°C with 100µl of carbonate buffer pH 9.6-0,1M containing 10µg of antigen of *T. gondii*. After three washes with PBS-0,05% Tween 20, remaining binding sites were blocked for 1h at 37°C with 200µl of PBS + BSA 2%. After washing, 100µl of the serum or feces extracts of mice were added and plates were incubated for 1h at 37°C. After washing above, 100µl per well of anti-mouse IgA and IgG peroxidase conjugate (Sigma®). After washing, the reaction was revealed by the addition of 100µl OPD (o-phenylenediamine 1mg/ml) for 30 min. at room temperature. The enzymatic reaction was stopped by 200µl per well of 4N HCl solution. The reading was done spectrophotometrically (Labsystems Multiskan MS®) at 492nm [11]. For IgG subclasses, serum dilutions, 100µl, were added to each well and the plates were incubated for 1h at 37°C. After additional washing with PBS-T, bound IgG were detected by incubation for 1h with peroxidase-conjugated anti-mouse anti-IgG1, anti-IgG2a and anti-IgG2b (Southern Biotechnology Associates®) at 37°C, followed by 5 washings with PBS-Tween. The bound conjugate were developed with 100µl per well of OPD (o-phenylenediamine 1mg/ml) by 30 min., stopped with 100µl per well of citric acid 0,2M, and the absorbance read at 450nm in an ELISA reader (Dynatech MR4000®).

2.4. Challenge and histopathology of immunized mice

Tissue cysts of *T. gondii* ME49 strain were obtained from the brains of chronically infected C57Bl/6j. Brains were homogenized in 30% dextran in Hanks's balanced salt solution (HBSS). This mixture was centrifuged at 3000g for 10min. at 4°C and the pellet was re-suspended in HBSS [12]. Tissue cysts were counted at optical microscope. The immunized mice were challenged after 15 days from the last dose with 10 cysts by oral route. The control with normal C57Bl/6j mice were challenged with the same quantity of cyst. The mortality of the animals was followed daily. After 30 days, all mice were killed and the brains were separated for histology and cyst counting. Half brain was homogenized in ten volumes of saline solution and was observed for cysts in at least 0.1 ml under phase contrast microscopy, allowing the estimation of number of cysts/ brain. Remaining intact brain tissue were fixed in several changes of phosphate buffered (pH 7,2) 4% formaldehyde. Those organs were included in paraffin, and 5µm thick section were stained with hematoxylin-eosin. When necessary, representatives filed were photographed in a Zeiss Axiophot microscope, with planapochromatic optics.

3. RESULTS

The IgA and IgG production in the serum was clearly seen after the first oral dose, increasing thereafter, more intense in the IgG response, but immunized mice produced smaller levels of serum antibodies as compared to chronically infected mice (Fig. 1).

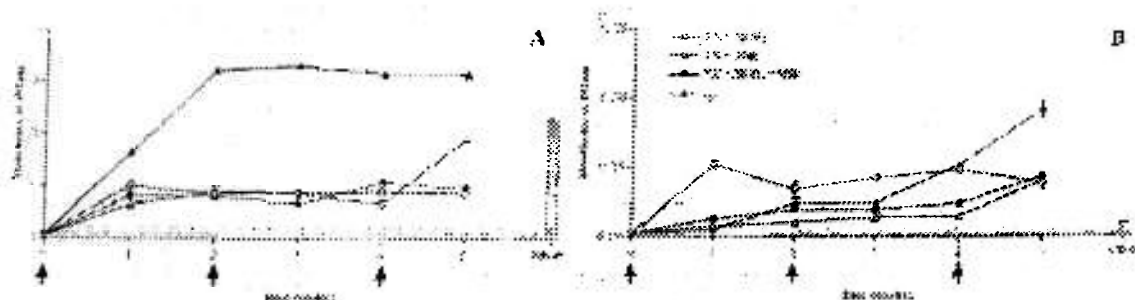


Figure 1 – Specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG(A) and IgA(B) antibody in C57Bl/6j mice serum immunized with 1, 2 and 3 doses with 10^7 tachyzoites RH strain, 255 Gy irradiated (oral route) with aluminum hydroxide (TX+Al(OH)₃) and/or suspended in bovine milk (TX+Milk), detected by ELISA. Days of immunization procedures are indicated by black arrows.

The levels of IgG subclasses were analyzed by ELISA to determine the proportion produced in the immunized groups with irradiated tachyzoites, with different adjuvants. The group immunized i.p. and the group with ME-49 presented the higher level of 3 classes analyzed. The groups immunized presented a increase in the level of IgG2b subclasses, as observed in the control groups (Fig. 2).

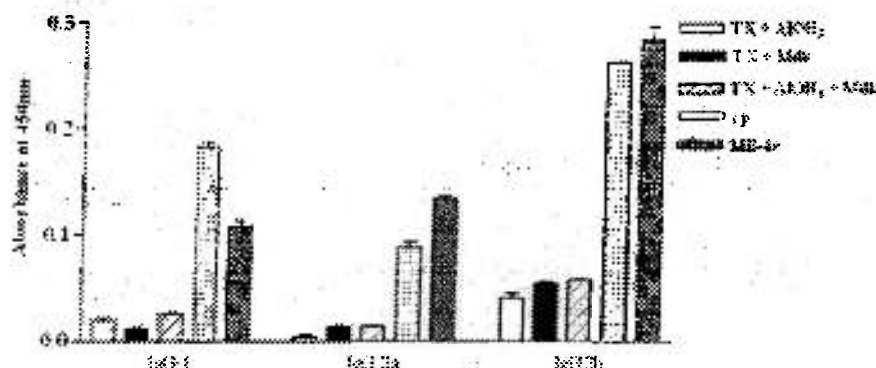


Figure 2 – Evaluation of IgG subclasses produced in C57Bl/6j in response to oral immunization with irradiated tachyzoites of *T. gondii*, in different adjuvants or i.p. (3doses).

Fecal IgG production was absent after immunization but IgA production was higher than controls during the first doses but decays after this, suggesting tolerance, with chronically infected mice presented higher levels of IgA in feces (Fig. 3).

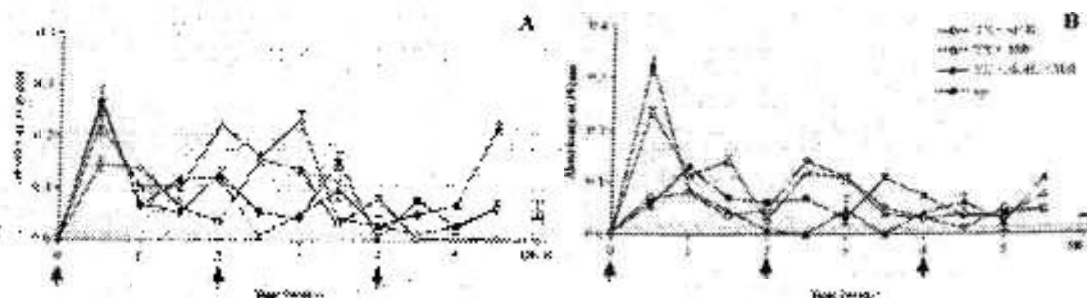


Figure 3 – Specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG(A) and IgA(B) antibody in C57Bl/6j mice feces immunized with 1, 2 and 3 doses with 10^7 tachyzoites RH strain, 255 Gy irradiated (oral route) with aluminum hydroxide (TX+Al(OH)₃) and/or suspended in bovine milk (TX+Milk), detected by ELISA. Days of immunization procedures are indicated by black arrows.

To evaluate the vaccine efficiency, the immunized groups were challenged with 10 cysts of ME-49 strain by oral route. Only in the control group occurred the death of 1 animal after 13 days from challenge, which presented large numbers of cyst in brain, showed in squash preparation on phase contrast microscopy. The immunized groups did not show any death and all mice presented some protection after challenge, when they were compared with the non-immunized group ($P < 0.001$), with the higher protection occurring in the group immunized by parenteral route and in the group immunized with aluminum hydroxide ($P < 0.001$), the difference of the cyst numbers were higher and less cysts were found in the brain, usually less than 500 brain cysts/animal and similar to i.p. immunized mice (Fig. 4A). The brain histopathology of immunized animals with irradiated tachyzoites and challenged with 10 cysts of ME-49 strain, showed similar protection found in the quantitative studies of cyst brain load (Fig. 4).

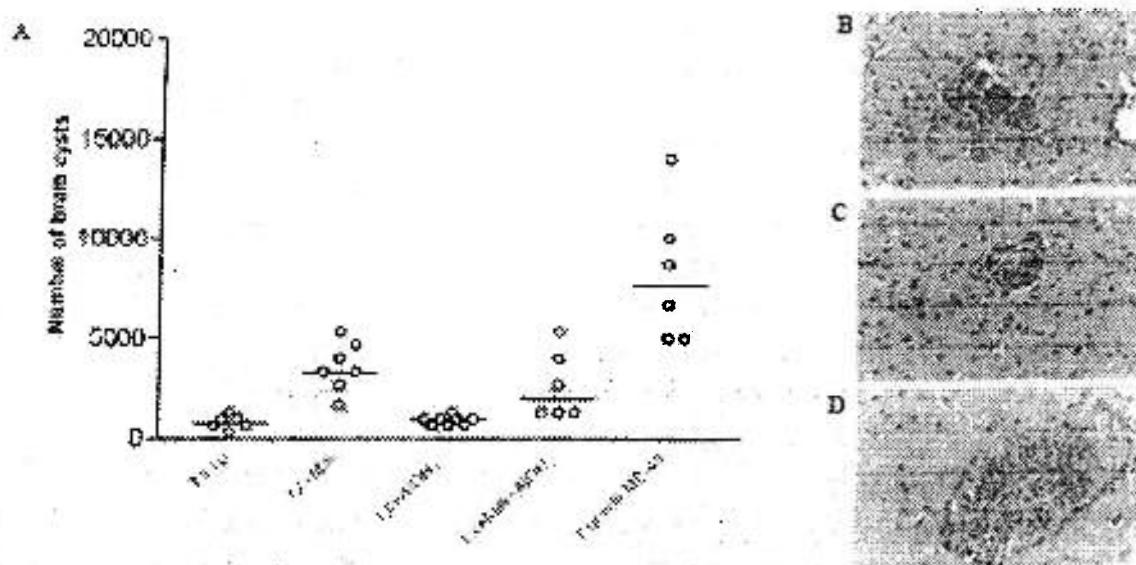


Figure 4 – (A) Number of brain cysts, after 30 days from oral challenge with 10 cysts of ME-49 strain, in mice immunized with different doses and immune project. Brain histopathology of mice challenged with ME-49 strain, without immunization (A). Immunized by parenteral route (B) or immunized by oral route with aluminum hydroxide as adjuvant (C).

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The use of antacids or protein in order to enhance the survival of the agent at stomach level was demonstrated by the 100% killing of mice groups, with acute disease of few days duration, in experiments when aluminum hydroxide or protein competitor as bovine milk are used as vehicle for non-irradiated viable tachyzoites. This was expected by the increased virulence when mice was challenged with milk or home-made cheese contaminated with viable tachyzoites [13].

When those vehicles are used for irradiated tachyzoites, no infection or deaths was present as expected and a clear humoral response could be seen, showing that those tachyzoites became antigenic to those mice, despite an lower titer of antibody after the 3rd oral dose, that could be ascribed to an tolerance effect, as suggested by others in oral vaccines [14]. When stools are used as antibody source, low levels of IgG was found, similarly to previously reported data dealing with *T. gondii* antigen associated to cholera toxin [15]. When IgA was tested in

those samples, the production was observed only in the first two doses of oral challenge, mostly on preparations with antipeptics.

The IgG subclasses results showed similar levels of production of each subclass, both in parenteral vaccinated mice or natural infection, which showed similar immune response in this model as natural infection. When oral route of vaccination was analyzed, the production of IgG subclasses was much smaller, but present, especially when alum hydroxide is used as adjuvant, which could be attributed to a protection to the acid environment of the gastric juice.

When we submit those immunized animals to oral challenge with cysts of ME-49 strain, we note that all groups, both oral or parenteral vaccinated, presented some protection to the infection, as compared to the control group. Again, we also observed a higher efficiency of aluminum hydroxide as adjuvant, resulting in protection similar to parenteral vaccine. This data is not associated with higher levels of serum IgG subclasses, despite the higher levels found in this model, but much lower than the obtained in parenteral vaccination [7]. Thus the protection must be related in some order to antibody production but other factors could also be involved in this process. Interestingly, the best protection showed the higher levels of IgG2a, usually associated to a Th1 immune response, usually associated with a cytotoxic CD8 response [16].

All this data show the possibility of development of an oral vaccine to toxoplasmosis, which much more feasibility than parenteral ones. This vaccine could be useful as attractive baits in the environment to affect the free living cats, promoting a decrease in excretion of oocysts by cats and reducing the environment transmission of toxoplasmosis, in an approach ecologically correct, without the risks of direct intervention in the human populations.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Roselaine Alvim Pereira Cardoso for him help in laboratory preparations and Eng^o Carlos G. Silveira and Eng^a Elizabeth S. R. Somessari from IPEN to technical assistance during irradiation. CAPES and LIMHCFMUSP-49 supported this work. Galisteo Jr., A.J. was a fellow from CNPq (141404/2004-3).

REFERENCES

1. Montoya, J.G.; Liesenfeld, O., "Toxoplasmosis". *Lancet*. **12**; 363(9425): 1965-1976. (2004).
2. Passos, L.N.; Araújo-Filho, O.F.; Andrade Jr., H.F., "Toxoplasma encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis." *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **42**(3): 141-145. (2000).
3. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A., "Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts." *Clin. Microbiol. Rev.*, **11** (2): 267-299. (1998).
4. Kasper, L.; Courret, N.; Darche, S.; Luangsang, S.; Mennechet, F.; Minns, L.; Rachinel, N.; Ronet, C.; Buzoni-Gatel, D., "Toxoplasma gondii and mucosal immunity" *Int. J. Parasitol.*, **34**(3): 401-409 (2004).
5. Buxton, D., Thomson, K., Maley, S. Wright, S.; Bos, H.J., "Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant." *Vet. Rec.*, **129**(5): 89-93. (1993).

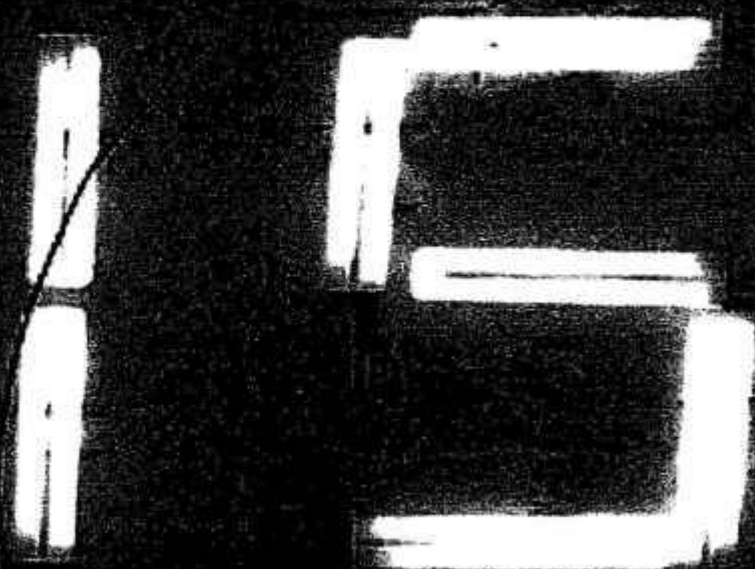
6. Leyva, R.; Herion, P.; Saavedra, R., "Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*." *Parasitol. Res.*, **87**(1): 70-79. (2001).
7. Hiramoto, R.M.; Galisteo Jr.; A.J.; Nascimento, N.; Andrade Jr., H.F., "200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice", *Vaccine*, **20**(16), 2072-2081 (2002).
8. Li, T.; Takeda, N.; Miyamura, T.; "Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice." *Vaccine*, **19**(26): 3476-3484. (2001).
9. Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, **7**(72), 248-254. (1976).
10. Camargo, M.E.; Ferreira, A.W.; Mineo, J.R.; Takiguti, C.K.; Nakahara, O.S., "Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns", *Infect. Immun.*, **21**(1): 55-58. (1978).
11. Venkatesan, P.; Wakelin, D., "Elisas for parasitologists: or lies, damned lies and Elisas." *Parasitol. Today*, **9**(6): 228-232. (1993).
12. Booth, K.S.; James, E.R.; Popiel, I., "Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*", *Cryobiology*, **33**: 330-337. (1996).
13. Hiramoto, R.M.; Mayrbaur-Borges, M.; Galisteo Jr., A.J.; Meireles, L.R.; Macre, M.S.; Andrade Jr., H.F., "Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese". *Rev. Saude Publica*, **35**(2), 113-118. (2001).
14. Iijima, H.; Takahashi, I.; Kiyono, H., "Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases". *Rev. Med. Virol.*, **11**(2): 117-133. (2001).
15. Bourguin, I.; Chardes, T.; Mevelec, M.N.; Woodman, J.P.; BOUT, D., "Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using cholera toxin". *FEMS Microbiol. Lett.*, **65**(3): 265-271. (1991).
16. Debard, N.; Buzoni-Gatel, D.; BOUT, D., "Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection". *Infect. Immun.*, **64**(6): 2158-2166. (1996).

AGROPECUÁRIAS
BIOLÓGICAS
ENGENHARIAS E EXATAS
HUMANAS

2007 SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

15º SIICUSP

USP



Resumo do Trabalho:

Toxoplasma gondii vs. Radiação ionizante: estudo da memória imunológica, através da resposta humoral, em camundongos imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos irradiados

Nahara Esteves Zorgi¹, Andrés Jimenez Galisteo Jr.^{1,2} e Heitor Franco de Andrade Jr.¹

1-Instituto de Medicina Tropical de São Paulo / USP

2-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN)

Objetivos:

Avaliar a memória imunológica induzida por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos irradiados de *T. gondii*, pela produção e avides de anticorpos específicos.

Material e Métodos:

Foram utilizados taquizoítos de *T. gondii* submetidos à irradiação, na doses de 255Gy com blindagem de 90%, pela exposição a raios- γ de uma fonte de ^{60}Co (Gammacell[®], Atomic Energy of Canada), de forma homogênea, com presença de O_2 e uma taxa de dose de 3,84 kGy/h [1]. Camundongos C57BL/6j e BALB/c foram imunizados via oral e intraperitoneal com três doses a cada 15 dias com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy. A detecção dos níveis de anticorpos IgG e IgA, no soro, foram realizadas por ELISA. A avides foi realizada, seguindo o mesmo protocolo do ELISA, com a adição de uréia 6M após a etapa de incubação dos soros. Os camundongos imunizados foram desafiados após 15 dias do último inóculo com 10 cistos por via oral e após 30 dias, esses animais foram sacrificados e os cérebros macerados em salina, e o número de cistos foram determinados por microscopia óptica convencional [2].

Resultados:

Os níveis de IgG foram superiores nos animais que receberam inóculo i.p., porém os níveis de IgA foram maiores nos animais imunizados v.o. Isso se deve ao fato da via de administração do imunógeno (Fig. 1 e 2).

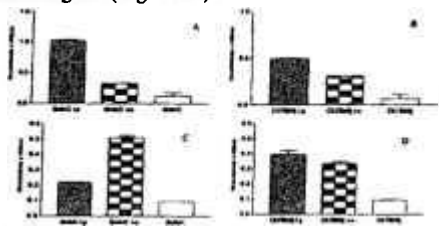


Figura 2: Níveis de anticorpos específicos IgG (A e B) e IgA (C e D) no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6j imunizados com *T. gondii* irradiados.

Os grupos imunizados via i.p. obtiveram uma avides de anticorpos superior aos grupos imunizados por via oral (Fig. 3)

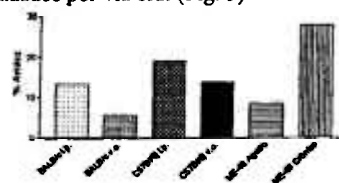


Figura 3: Avides de anticorpos específicos IgG no soro dos camundongos BALB/c e C57BL/6j imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados.

Após o desafio, notamos que os camundongos BALB/c apresentam altos níveis de proteção, quando comparados com os C57BL/6j imunizados, provavelmente pela diferença de perfil de resposta Th entre essas linhagens (Fig. 4).



Figura 4: Desafio com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* em camundongos BALB/c e C57BL/6j imunizados com taquizoítos irradiados.

Conclusões:

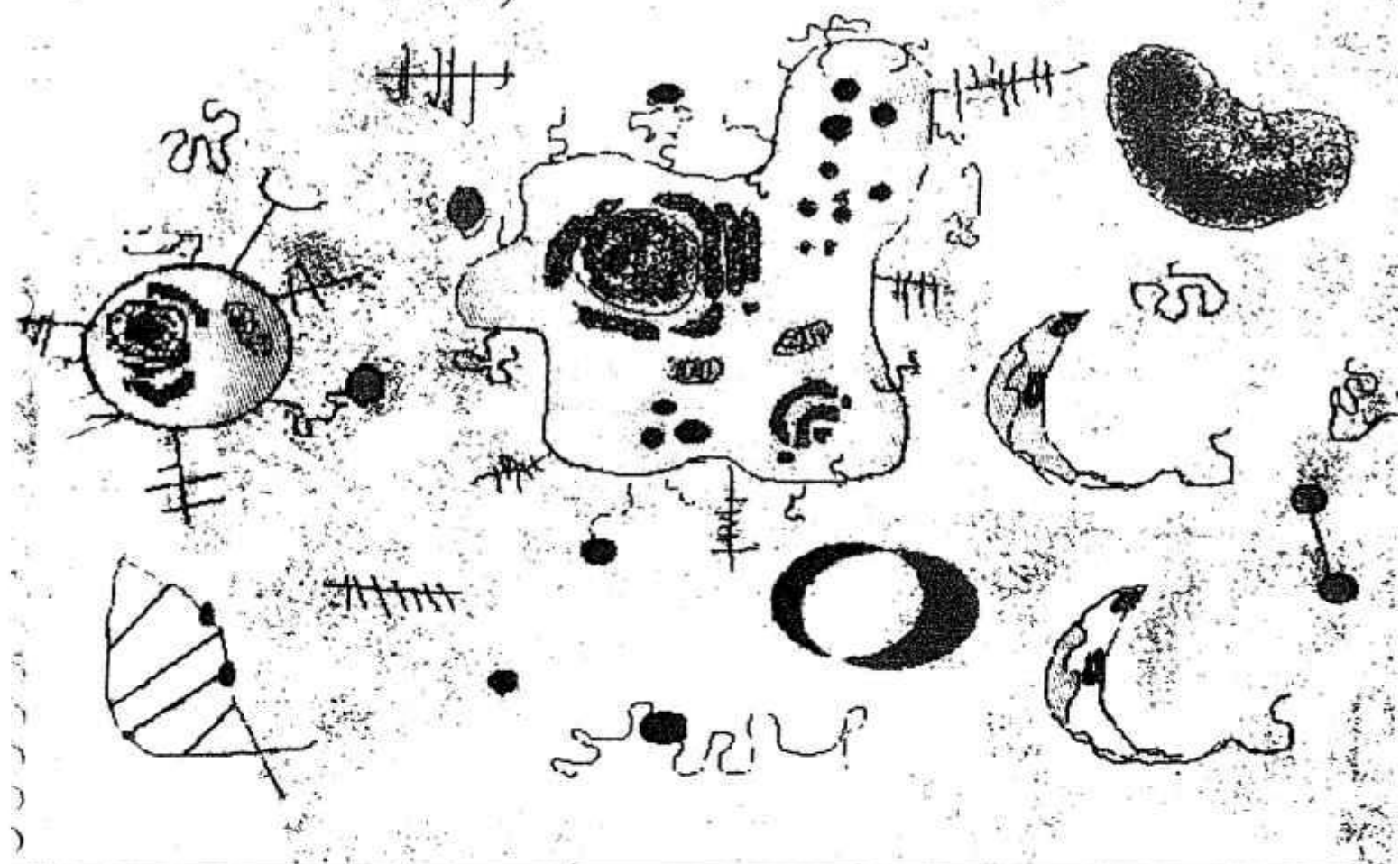
Animais imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados com uma dose de 255Gy, induzem uma resposta imunológica, produzindo anticorpos específicos no soro, com maiores níveis de produção de anticorpos IgA quando imunizados via oral e maiores níveis de anticorpos IgG quando imunizados por via intraperitoneal. Os animais BALB/c, apresentaram maiores níveis de proteção contra cepa cistogênica ME-49.

Referências Bibliográficas:

- [1] HIRAMOTO, R.M. et al., Vaccine, 20(16): 2072-2081 (2002).
- [2] GALISTEO JR, A.J. et al., The Int. Nuclear Atlantic Conference (2005)

**XXIV Annual Meeting on Basic
Research in Chagas' Disease**

**XXIV Annual Meeting of the Brazilian
Society of Protozoology**



- Biochemistry and Chemotherapy
- Control of Gene Expression
- Vaccine Development
- Immunomodulation
- Evolution and Epidemiology
- Structural Biology
- Vector Control
- Cell Biology

November 5-7 2007 • Caxambu • MG • Brazil

Informations: sbpz@sbpz.org.br www.sbpz.org.br

binant vectors. By doing this, a much higher degree of protection could be elicited in all cases against a challenge with the corresponding live parasites. Not only the numbers of IFN γ -producing cells or the antibody titers, but also the *in vivo* cytolytic capacity of the vaccine-induced T lymphocytes was augmented in this situation. Curiously, although not an isolated finding when considered recent reports found in the literature, the prime-boost protocol that induced the highest levels of Th1-related immune memory was the one that not only induced IFN γ and TNF α but also induced the highest levels of interleukin 4 (IL-4) after the boost. The conclusions drawn from these experiments and their future applicability in a real clinical setting will be discussed during our presentation.

IM04 - BALB/c MICE VACCINATED WITH ADJUVANT-FREE SERINE PROTEASES OF *Leishmania amazonensis* ARE DIFFERENTIALLY PROTECTED AGAINST *Leishmania major* AND *Leishmania amazonensis*.

GUEDES, HLM (UFRJ); CHAEZ, SP (UFRJ); DE-SIMONE, SG (FIOCRUZ); ROSSI-BERGMANN, B (UFRJ)

Leishmania amazonensis is the main agent of the anergic diffuse cutaneous leishmaniasis in man. We have shown that the *L. amazonensis* promastigote antigens (LaAg) induce T-cell anergy *in vitro* and exacerbated cutaneous leishmaniasis in mice. Here, we compared the immunogenicity of serine proteases of *L. amazonensis* promastigotes with LaAg *in vitro*, and the effect of vaccination of BALB/c mice on *L. amazonensis* or *L. major* infection. Serine proteases were purified from detergent-solubilized extract of *L. amazonensis* promastigotes using aprotinin-agarose affinity chromatography, and were herein named LSPI. To compare the capacity of immune T cells to respond to LSPI and LaAg *in vitro*, lymph node cells from 7-day infected (*L. amazonensis*) BALB/c mice were re-stimulated with 50 μ g/ml of LSPI and 50 μ g/ml of LaAg. Cell proliferation was measured by MTT and the production cytokines was measured in the supernatants by ELISA. We observed that contrary to LaAg, LSPI activated T cell proliferation and inhibited the spontaneous production of both TGF- β and IL-10. *In vivo*, mice received two intramuscular injections with 25 μ g of LSPI with no adjuvants, with a 7-day interval. Seven days later, they were infected in the footpads with either *L. amazonensis* or *L. major*. We found that vaccination increased mouse resistance to infection with *L. major*, but not with *L. amazonensis*. Only when saponin was used as an adjuvant during vaccination were mice protected against *L. amazonensis*. Protection was accompanied by increased T cell activation *in vivo*, as measured by higher spontaneous cell proliferation *ex vivo*. These results show that the disease-promoting effect of LaAg is unlikely due to the presence of LSPI. Also, they show that *L. amazonensis* and *L. major* respond in a different manner to vaccination with serine proteases of *L. amazonensis*, possibly because of the higher anergenic feature of the later.

IM05 - Difference in intestinal response of C57BL/6J and BALB/c mice immunized with irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* RH strain

GALISTEO JR, A.J. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); ZORGI, N.E. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); DE ANDRADE JR, H.F. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

Toxoplasma gondii, a worldwide protozoan disease, causes severe disease, in fetus of pregnant women and immunocompromised hosts. Infection with *T. gondii* naturally occurs through ingestion of raw or undercooked meat containing cysts or through contact with oocysts from cat feces. Vaccines could results in low dissemination specially if orally administered to cats. Oral vaccines depend of good development of intestinal immunity. Irradiated *T. gondii* tachyzoites induce significant protection to mice, similar to chronically infected animal. We studied mucosal immune response of C57Bl/6j and BALB/c mice, immunized with 10⁷ tachyzoites radiation sterilized (255Gy/60Co) *T. gondii* RH strain (oral or parenteral route), with 3 biweekly doses. Anti-*T. gondii* antibody specific for IgG and S-IgA were detected in feces of the immunized mice, by ELISA. We evaluated the intestinal epithelial of immunized mice, to assess the integrity and penetration of irradiated parasites *in vivo* by electron microscopy. Fecal S-IgA and IgG secretion was found to be more expressive in oral immunized mice. Intraperitoneal immunization induced differences in production of fecal S-IgA and IgG between mice strains, with higher levels in BALB/c mice. Electron microscopy studies showed intact parasites invading the inner intestinal mucosal, with adequate morphology and mechanisms of invasion, probably due to parasite resistance and alum hydroxide reduction of acid condition of stomach. Our results had demonstrated that irradiated parasites maintain their cell biology and immunogenic properties, adequate for the development of an oral immunogen, to be used in animals, through possibly attractive baits. Galisteo Jr., A.J. is a fellow of CNPq (141404/2004-3). This work was supported by CNPq and LIMHCFMUSP-49

IM06 - EFFECTS OF AMMONIUM MOLYBDATE ON THE DEVELOPMENT OF CUTANEOUS LESIONS AND THE IMMUNE RESPONSE TO *Leishmania (V.) braziliensis*

FIGUEIREDO, A. B. (Universidade Federal de Ouro Preto); MARQUES-DA-SILVA, E. A. (Universidade Federal de Ouro Preto); OLIVEIRA, J. C. (Universidade Federal de Ouro Preto); FIETTO, J. L. R. (Universidade Federal de Viçosa); AFONSO, L. C. C. (Universidade Federal de Ouro Preto)

Infection of mice with *Leishmania (V.) braziliensis* results in self-healing cutaneous lesions. The membrane of this parasite contain enzymes (NTPDase and 5'-nucleotidase) that

November 6-8 2006
Caxambu MG Brazil

XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology

XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease

Chemotherapy

Epidemiology

Diagnosis

Immunology

Development

Pathology

Genetics

Physiology

treated with IFN- γ , there was a slight but significant inhibition of parasite growth. This datum points towards a IFN- γ dependent, iNOS independent pathway of inhibiting parasite growth in macrophages. It is possible that the lack of NO exacerbates the production of ROS, which would partially control the growth of parasites. On the other hand, phox-/mice don't show large difference when compared with WT. This study sheds light on other mechanisms involved in the control of growth of *L. amazonensis* in macrophages. Support: CNPq, CAPES and FAPEMIG.

IM55 - *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates induce vasodilation and vascular permeability increase in the hamster cheek pouch.

SVENSJO, E. (Universidade Federal do Rio de Janeiro); LEMELLE, N. S. (Universidade Federal do Rio de Janeiro); SCHARFSTEIN, J (Universidade Federal do Rio de Janeiro); SARAIVA, E.M. (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Saliva of sand flies contains potent pharmacological components that facilitate *Leishmania* transmission. Apart from assisting vectors needs in obtaining their blood meals, the sand fly saliva induces host responses that modulate inflammation and anti-parasite immunity. In the present study we explored the potential contribution of *L. longipalpis* saliva to the invasion and infection of *Leishmania* parasites. Salivary glands were dissected from non-fed, non-infected sand flies, sonicated and stored at -80°C until used in intravital microscopy experiments. Salivary gland homogenate (SGH), equivalent to half a salivary gland was applied topically to cheek pouches of anesthetized hamsters ($n = 5$) after i.v injection of FITC-dextran. Arteriolar diameters and vascular permeability changes were measured at 5 min intervals. SGH caused an immediate arteriolar dilation ($P < 0.05$) at 2 min following its application and reached a maximal diameter of $52 \pm 20\%$ (mean $\pm$ SD) above pre-SGH diameter at 15 min. Vascular permeability responses increased ($P < 0.05$) to maximum of $44 \pm 8\%$ above pre-application control level at 15 min. A secondary challenge with SGH at 60 min after the first application resulted in a significant dilation ($52 \pm 27\%$, $P < 0.05$) but there was no increase in vascular permeability. Secondary challenge only evoked discrete responses in vascular permeability indicating that the vascular bed was desensitized, as observed after ischemia/reperfusion injury or topical application of different *Leishmania* parasites. Hamsters ($n = 4$) treated with bradykinin-2-receptor antagonist HOE-140 plus SGH showed similar dilation effects but a smaller increase in vascular permeability than SGH alone. Salivary gland homogenate (SGH) induced reproducible effects and can be used for further studies on the role of salivary gland components for *Leishmania* transmission. Supported by: CNPq, FAPERJ.

IM56 - SERUM RESPONSE IN C57BL/6J, BALB/C AND SWISS MICE IMMUNIZED

WITH IRRADIATED TACHYZOITES OF *Toxoplasma gondii* RH STRAIN AND ORAL CHALLENGE WITH ME-49 STRAIN

GALISTEO JR., A.J. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); ZORGI, N.E. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); BAPTISTA, J.A. (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares); HIRAMOTO, R.M. (Instituto Adolfo Lutz); DO NASCIMENTO, N. (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares); DE ANDRADE JR., H.F. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

Toxoplasmosis, a prevalent widespread infection in man and animals, is mainly transmitted by oral route, through ingestion of oocysts from water and food contaminated with cat feces or infected animal tissue cysts in undercooked meat. Vaccine development implies in effective intestinal immunity, the first site of parasite entry. Radiation (255Gy/60-Co) sterilized *T. gondii* RH strain tachyzoites (RST) induced significant protection when parentally administered, similar to chronically infected and acute disease protected animal. We study the humoral immune response in C57Bl/6j, Balb/c and Swiss mice immunized with 10^7 RST, by oral or parenteral 3 biweekly administration. *T. gondii* antigens specific ELISA for IgG, IgA, IgG1, IgG2a and IgG2b detection was performed in weekly blood samples during immunization. After 2 weeks, immunized and control animals were challenged with 10 cysts of ME49 strain p.o. Protection was determined at the 30th day for *T. gondii* cysts counting in brain. All immunized mice groups presented significant protection when challenged with ME-49 cysts; however, Balb/c mice showed better protection levels, with only one positive animal on brain microscopic analysis. IgG production in the serum of the animals was higher in groups immunized by i.p route; however, IgA and IgG1 levels were higher in Balb/c mice immunized by oral route. This higher protection found in Balb/c group could probably also be related to the Th2 response, demonstrated by higher IgG1 levels. All these data provide insights in oral immunization schedules for toxoplasmosis prevention, suggesting that oral immunization could be an alternative in the prevention of toxoplasmosis and the block of chain transmission. Galisteo Jr., A.J. is a fellow of CNPq (141404/2004-3). This work was supported by CNPq and LIMHCFMUSP-49

IM57 - Strain specific antibodies using synthetic peptide ELISA in the diagnosis in *T. gondii* infections

OBEID, M.A. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); TSUTSUI, V.S. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); MARCIANO, M.A.M. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); GALISTEO JR., A.J. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); DE ANDRADE JR., H.F. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

Toxoplasma gondii is a highly prevalent heteroxenous apicomplexan, affecting warm-blooded vertebrates. Despite

asymptomatic chronic infections in most people, toxoplasmosis could cause acute infection with lymphadenopathy, chorioretinitis, and fatal encephalitis in immunosuppressed patients or fetus. *T. gondii* is one unique species but there are at least 3 phenotypic and genotypic defined strains, with diverse virulence and geographical distribution. In Brazil, *T. gondii* types I and III strains were found, without isolation of type II strain. The diagnosis of each strain type relies on isolation and genotype analysis, a time-consuming and difficult task. Recently, there are reports of strain specific epitope markers, which allow strain identification by specific antibody production. We tested a set of human serum samples, previously screened for anti-*T. gondii* antibodies, to evaluate its parasite strain-specificity using synthetic peptides. ELISA were performed using *T. gondii* total lysate and synthetic peptides from dense granule antigens, GRA6-I/III (LPRERVNVFDY) and a derived sequence from GRA6-II (LHPGSVNEFD). The coupling efficiency to the carrier protein bovine serum albumin via glutaraldehyde was over 35%, by using ³H-proline and ³H-leucine. We found that most sera reacted more intensely with I/III peptide, but a few sera presented higher reaction with type II peptide. These findings corroborate the high prevalence of types I and III strains in Brazil. Further studies with synthetic peptides using association of specific peptides could improve the strain identification in *T. gondii* infection, allowing screening of specific strain related diseases. This work is supported by LIMHCFMUSP, CNPq and Fundap.

IM58 - Detection of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Dogs from northwest region of São Paulo state, Brazil

AURELIANO, D. P. (*Instituto Adolfo Lutz*); MOTOIE, G. (*Instituto Adolfo Lutz*); TOLEZANO, J.E. (*Instituto Adolfo Lutz*); TANIGUCHI, H.H. (*Instituto Adolfo Lutz*); HIRAMOTO, R.M. (*Instituto Adolfo Lutz*)

Toxoplasma gondii is an obligate parasite widespread throughout the world. It affects warm-blooded animals, including man, birds and domestic animals. The infection occurs by ingestion of oocysts excreted in faeces of infected felines or by ingestion of raw and undercooked meat containing cysts. Infected individuals with *T. gondii* are generally asymptomatic but ocular damage can occur. The microorganism can cause serious diseases in immunocompromised patients and fetus of primary infection of pregnant woman. *Toxoplasma* infection in man and dogs are very common as demonstrated by various serological surveys. Considering this fact, it is possible to use dogs as an important tool environmental indicator of *Toxoplasma gondii* contamination. We have evaluated serum samples of domestic animals from Araçatuba, Guararapes, Mirandópolis and Andradina, São Paulo state, Brazil. A total of 200 blood samples were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The sera-prevalence of *T. gondii* infection was determined by a specific IgG ELISA with respectively 55,1%, 57,1%, 40% and 52% in these cities. The positive percentage of samples in all

cities was 51%. These results were obtained from domestic dogs and show the risk those animals have been exposed. Probably the population has a similar exposure risk. To sum up, both dogs and humans can be exposed to common sources of infection what is an indication that the parasite is disseminated in the urban areas.

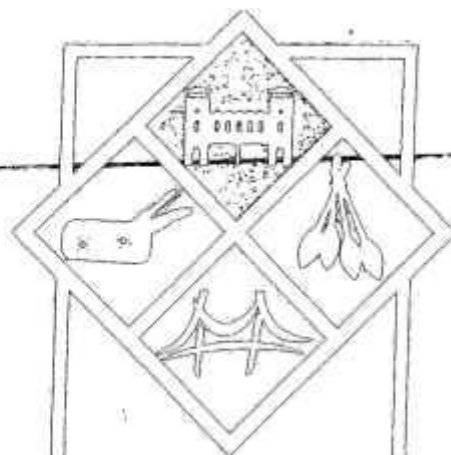
IM59 - EXPRESSION, ANTIGENICITY AND CIRCULAR DICHROISM STUDIES OF THE RECOMBINANT MEROZOITE SURFACE PROTEIN-3 ALPHA AND BETA OF *PLASMODIUM VIVAX*.

JIMENEZ, M.C.S. (*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas*); RICCI, R. (*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas*); RAMOS, C.H. (*Centro de Biologia Molecular Estrutural*); CHITNIS, C.E. (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology*); BARNWELL, J.W. (*Division of Parasitic Diseases*); GALINSKI, M.R. (*Division of Parasitic Diseases*); RODRIGUES, M.M. (*Universidade Federal de São Paulo*); SOARES, I.S. (*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas*)

In previous immuno-epidemiological studies of the naturally acquired antibody responses to Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium vivax*, we had evidence that the responses to distinct blood stages antigens could be differentially regulated. The present study was designed to evaluate the antigenicity of the recombinant proteins representing the Merozoite Surface Protein-3 alpha and 3 beta of *P. vivax* in 220 individuals from the State of Pará, in the north of Brazil. Recombinant proteins representing the C-terminal region of MSP-3 alpha and different regions of MSP-3 beta (N and C-terminal and full-length protein) were expressed in *Escherichia coli* from vectors histidine-tagged. Circular Dichroism (CD) spectroscopy was used to probe the secondary structure of each one recombinant protein representing MSP-3 alpha and MSP-3 beta. These recombinant proteins were compared in their ability to bind to IgG antibodies of serum samples collected from malaria exposed individuals. Recombinant proteins representing of the region II of Duffy Binding Protein (PvDBP-RII) and C-terminal region of MSP-1 (MSP1₁₉) were also tested for comparison. During patent infection with *P. vivax*, the frequency of individuals with IgG antibodies to MSP-3 alpha and at least one recombinant protein representing MSP-3 beta were 68.2% and 79.1%, respectively. The frequency of individuals with IgG antibodies to MSP1₁₉ was higher (95.0%) and of the greater magnitude. In contrast, the frequency of individuals with IgG antibodies to PvDBP-RII was lower (44.5%), however the frequency of responders increased after the second episode of the disease. Individually, the antibody levels to MSPs significantly declined nine months after treatment, except to full-length MSP-3 beta. Our results provide the first observations on human antibody responses to MSP-3 alpha and MSP-3 beta and confirm a complex regulation of the immune response to distinct blood stage antigens that can contribute to the high risk of re-infection in these individu-



REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL



XI CONGRESSO
DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
MEDICINA
TROPICAL

ENCONTRO DE
MEDICINA TROPICAL
DO CONESUL

OS DESENVOLVIMENTOS

FLORIANÓPOLIS

Santa Catarina - Brasil
Centro de Convenções CentroSul

PR 98

APLICABILIDADE DA PCR COMPETITIVA-QUANTITATIVA NO MONITORAMENTO DA PARASITEMIA DE PACIENTES CO-INFECTADOS *Trypanosoma cruzi*/HIV COM E SEM REATIVAÇÃO PRÉ E PÓS TERAPÊUTICA

Vera Lúcia T Freitas^{1,6}; Ana Marli C. Sartori²; Karim Y Ibrahim²; Lúcia M.A. Braz³; Elisabete V. Nunes⁴; Antônio R Teixeira⁵; Maria A. Shikanai-Yasuda^{1,2,6}

Laboratório de Imunologia HCFMUSP¹; Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias HCFMUSP²; Laboratório de Parasitologia HCFMUSP³; Setor de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz⁴; Laboratório de Pesquisa Multidisciplinar em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília⁵; Depto. de Moléstias Infecciosas e Parasitárias⁶, vera_lucia@yahoo.com.br

Introdução: Considerando-se a elevada letalidade da reativação da Doença de Chagas em imunodeprimidos, é de extrema importância a vigilância da reativação visando intervenção terapêutica com a maior precocidade possível. A reativação é caracterizada pelo encontro do *Trypanosoma cruzi* por exame direto no sangue e/ou líquido, no entanto, tal técnica apresenta baixa sensibilidade. Métodos de enriquecimento indireto, hemocultura e xenodiagnóstico, são de elevada sensibilidade na doença aguda, mas podem apresentar-se positivos também na fase crônica. A leitura individual de ninfas, no xenodiagnóstico, permitiu monitorar o nível de parasitemia. Na co-infecção HIV e *T. cruzi* tem-se mostrado que uma elevada percentagem de ninfas positivas >30% é preditora de reativação da doença de Chagas em 50% dos casos, porém os métodos parasitológicos indiretos demandam tempo. Métodos moleculares, como a PCR qualitativa e a competitiva, tem sido propostos, por apresentarem maior sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados. **Objetivo:** Comparar o desempenho da PCR competitiva no monitoramento da parasitemia em pacientes co-infetados *T. cruzi*/HIV com e sem reativação. **Casística & Métodos:** Este estudo analisou 9 pacientes, destes 3 HIV+ com reativação da doença de Chagas, 6 tratados, sendo 3 co-infetados sem reativação, 2 óbitos (1 antes e outro durante tratamento). As amostras foram analisadas por QBC, Hemocultura e Xenodiagnóstico. Na PCR qualitativa e competitiva foram utilizados os iniciadores S35/36 (Ávila *et al.*, 1993; Centurion e Lara *et al.*, 1994). **Resultados:** Em pacientes co-infetados sem reativação observou-se que a parasitemia variou entre 100 a 625 parasitos/ml de sangue coletado na PCR competitiva, a hemocultura variou de 34 a 67% de tubos positivos e o Xenodiagnóstico 3 a 22% de ninfas positivas, em pacientes com reativação: de 313 a 6250 parasitos/ml de sangue coletado, 50 a 100% de tubos positivos e o xenodiagnóstico de 37 a 56% de ninfas positivas. Com 15 dias, de tratamento observou-se queda importante de parasitemia em um paciente reativado de 313 a 1 parasito/ml concomitante a hemocultura 100 a 17% e xenodiagnóstico 56 a 9%, e resultados negativos durante 7 anos de acompanhamento tanto pelos métodos moleculares como parasitológicos. **Conclusão:** Em estudo anterior já demonstramos uma variação de 2 a 40 parasitos/ml em pacientes com a doença de Chagas crônica. O presente trabalho demonstra parasitemia elevada em pacientes co-infetados *T. cruzi*/HIV sem reativação e ainda maior em pacientes com reativação. A PCR ainda mostrou-se útil no monitoramento do nível de parasitemia de pacientes antes, durante e depois o tratamento.

PR 99

ANALYSIS OF IgA, IgG AND SUBCLASSES IN SERUM AND BRAIN HISTOPATHOLOGY IN ORAL IMMUNIZED C57BL/6J MICE WITH IRRADIATED TACHYZOITES OF *Toxoplasma gondii*

Andrés J. Galisteo Jr.^{1,3}; Roberto M. Hiramoto^{1,2}; Cláudia V. do Carmo¹; Janaina B. Alves³; & Heitor F. de Andrade Jr.¹

1. IMTSP - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/USP - Laboratório de Protozoologia, 2. IAL - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório de Parasitoses Sistêmicas, 3. IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CNEN - Laboratório de Biologia Molecular

Introduction: Toxoplasmosis, a prevalent widespread infection in man and animals, occurs mainly through ingestion of water and food contaminated with oocysts from cat feces. There is no vaccine but significant protection was observed when mice were immunized with radiation-sterilized tachyzoites (RST), by subcutaneous injection. This vaccine could be more effective if used as environmental baits, for immunizing free-living cats. **Objective:** We study the immunity induced in mice by RST through the oral route, looking for serum levels of specific IgA, IgG and subclasses and quantitative protection studies. **Material & Methods:** RH strain tachyzoites were irradiated with 255Gy and stored in liquid nitrogen, used as immunogen (RST). Mice were immunized biweekly with 10⁷ RST by oral route (p.o.), suspended in milk and/or aluminum hydroxide. Specific ELISA for IgG, IgA, IgG1, IgG2a and IgG2b detection was performed in weekly blood samples during and after immunization, with challenge with 10 cysts of ME49 strain p.o. Protection was determined at the 30th day in brain by cyst counting and histological analysis. **Results:** The production of specific IgA and IgG in the serum was clearly seen after the first oral dose, increasing thereafter, more intense in the IgG response, but immunized mice produced smaller levels of serum antibodies as compared to chronically infected mice. S.c. immunized or infected mice presented high levels of all IgG subclasses while. P.O. immunized groups presented low levels of IgG2b, similar to controls, with other isotypes easily detected in all groups. When challenged, all immunized groups presented lower numbers of brain cysts, as compared to controls, without death or clinical signs. All mice immunized presented significant protection, compared to controls (P<0.001), with better protection i.p. and aluminum hydroxide groups. Other protocols provided partial protection (P<0.05) with less 500 cysts than controls, with confirmation by brain histology. The best protection was related to low levels of serum IgG2a, reported as a marker of Th1 immune response. The effect of aluminum hydroxide could be related to a buffering effect in gastric juice, allowing RST survival, while milk association can be insufficient to block the peptic digestion or competition among milk protein and *T. gondii* antigens. **Conclusion:** All these data provide insights in oral immunization schedules for toxoplasmosis prevention, allowing new studies that could result in effective baits for widespread environmental vaccination of free-living animals.

This work was supported by FAPESP (99/04926-6), CNPq (141404/2004-3), CAPES and LIMHCFMUSP-49

PR 100

INFECTION AND DISEASE CAUSED BY *L. chagasi* IN DOGS (*Canis familiares*) FROM ENDEMIC AREA OF SÃO LUIS ISLAND - MARANHÃO, BRAZIL

Arnaldo M. Garcia¹, Arlene Caldas¹, Antonio Augusto M. Silva¹, Vera Vinhas², Regis Gomes², Aldina Barral² e Jackson Costa²

1 - Mestrado Em Saúde e Ambiente da Universidade Federal Do Maranhão - UFMA, 2 - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPQGM/FIOCRUZ - Bahia

Introduction: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by the parasite *Leishmania chagasi* and is transmitted by the bite of a *Lutzomyia* sandfly. It has been recently determined that large numbers of individuals in endemic areas are infected with the parasite but do not develop the classical signs

Os pacientes de LC-Lg apresentaram índices de RPL à *Leishmania* significativamente inferiores aos observados nos casos de LC-Lb. Em 50% dos casos de LC-Lg a RPL foi negativa, enquanto os linfócitos de todos os casos de LC-Lb responderam aos antígenos parasitários. Nos indivíduos com RPL positiva, as células reativas à *Leishmania* que proliferaram foram preferencialmente T CD4+, tanto nos casos de LC-Lg quanto LC-Lb. Os resultados referentes à produção de citocinas estão em análise. Nossos resultados preliminares indicam que os pacientes LC-Lg apresentam uma baixa indução da resposta imune celular em relação àquela produzida por pacientes infectados com *L. braziliensis*. Romero e cols (2004) também verificaram níveis mais baixos de anticorpos específicos nos pacientes de LC-Lg. Estes dados sugerem que a resposta terapêutica insatisfatória, assim como as frequentes recidivas podem estar relacionadas à baixa indução da resposta imune desenvolvida por pacientes de *L. guyanensis*. A análise da produção de citocinas, bem como a melhor compreensão dos mecanismos que levam a esta baixa reatividade antigênica podem orientar a conduta terapêutica, abrindo a perspectiva de que estes pacientes possam se beneficiar de intervenções imunológicas. Apoio: CNPq, POM-IOC, PAPES/FIOCRUZ

PR 152

IMMUNODIAGNOSIS OF ANIMAL TOXOPLASMOSIS BY IgG AVIDITY ELISA

Luciana R. Meireles^{1,2}; Vinícius S. Tsutsui¹; Cláudia V. do Carmo¹; Andrés J. Galisteo Jr.¹; Henrique C. K. Terentowicz¹; Roberto M. Hiramoto³; Roselaine P. A. Cardoso¹; Heitor F. Andrade Jr.¹

1. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Lab. Protozoologia. 2. Instituto de Ciências Biomédicas - Departamento de Parasitologia. 3. Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.

Introduction: *Toxoplasma gondii*, worldwide highly infective protozoan parasite, infects humans and animals, with economic losses by fetal infection and abortion in veterinary medicine, related to acute or recent infections. Diagnostic serology for anti-*T.gondii* IgG does not discriminate between acute and chronic infections, which are especially significant in the search of a source of human infection. The selection of high affinity B cell clones during the immune response induces increasing immunoglobulin avidity, which could be predictive factor of infection period. Despite its usefulness, there are few reports on their use in veterinary medicine. **Objective:** In this study, we measure *T.gondii* IgG avidity in experimentally infected cattle, sheep, rabbit, cat and dogs. **Material & Methods:** Groups of at least 4 animals were infected and peripheric blood cells (PBC) were obtained before and during acute and chronic infection. Cyst was detected in 6 weeks or 6 months after infection by B1 gene PCR. Avidity IgG ELISA was calculated by several approaches using both single serum dilution or serial dilutions and titers (AVT), using 6M urea elution. **Results:** Avidity was effective in predicting infection period in all species, but diverse efficiency was observed in each species or determination method. The speed of avidity maturation is affected by the corporal mass of the infected animals or their susceptibility to the agent. PBC proliferation induced by the antigen corroborate that the avidity is dependent of cell selection. There are no relationship between antibody titers and tissue cysts, as demonstrated by PCR. Cysts were more frequent in recent six weeks infections as compared to chronic animals. In cats, the excretion of oocysts in the feces occurred very early in the infection, with low avidity antibodies. This fact could suggest that the presence of antibodies interferes with the production of oocysts. **Conclusions:** All those data shows the importance of IgG avidity in veterinary toxoplasmosis, a powerful tool for the diagnosis of this zoonosis, allowing the identification of the source of human outbreaks.

This work was supported by LIMHCFMUSP - 49 and CAPES.

PR 153

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE MALÁRIA ATENDIDOS NO HC-USP RIBEIRÃO PRETO DE 1998 A 2004.

Letícia de Melo, Rodrigo de Carvalho Santana, Gilberto G. Gaspar, Benedito A L da Fonseca.

Divisão de Moléstias Infecciosas – Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Av. Bandeirantes, 3900 – Campus Universitário – Ribeirão Preto – SP – CEP: 14048-900.

Introdução: A malária é uma doença causada por protozoário do gênero *Plasmodium* e configura-se, atualmente, como a antropozoonose de maior prevalência em todo o mundo, representando um dos mais graves problemas de saúde pública dos séculos XX e XXI. A malária é identificada predominantemente em áreas endêmicas, todas localizadas em regiões de clima tropical. O Brasil vem registrando altas taxas anuais da doença, merecendo destaque a região Norte e particularmente o estado do Amazonas. Os casos notificados são de distribuição heterogênea, com áreas de alto risco para transmissão, relacionadas a atividades ambientais, como desmatamentos, assentamentos, exploração de minérios, madeira e argila. Nas áreas endêmicas a doença predomina no verão e no início do outono, mas em áreas não endêmicas esta epidemiologia pode assumir padrão diferente. De alguma forma, o transporte contínuo de pessoas de áreas não endêmicas para áreas endêmicas acaba contribuindo para a transmissibilidade de um grande número de casos. **Objetivos:** Estabelecer um perfil epidemiológico dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto correlacionando procedência, ocupação, sexo, estado civil e idade. Retratar a espécie predominante, o grau de parasitemia, tratamento mais utilizado para cada situação e resposta ao tratamento preconizado. **Material & Métodos:** Estudo observacional, retrospectivo e longitudinal dos casos de malária atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto no período de 1998 a 2004. Foram avaliados 34 pacientes visando preencher um protocolo que completa os seguintes itens: idade, sexo, estado civil, ocupação, procedência, tempo de sintomas, espécie de *Plasmodium sp* identificado, parasitemia inicial, tratamento (incluindo tempo) e lâminas de verificação de cura. A análise dos dados foi apenas qualitativa, tentando mostrar as características dos pacientes com malária e que não pertencem à área endêmica. **Resultados:** O estudo teve 34 pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto no período de 1998 a 2004. As categorias profissionais com maior frequência dos casos foram caminhoneiro (26,5%) e lavrador (5,9%). Os locais prováveis de infecção tiveram como destaque o Estado do Pará (38,2%), Rondônia (29,4%), Mato Grosso (5,9%) e Amazonas (5,9%). A parasitemia do *Plasmodium falciparum* teve a média de 9717 parasitas/mm³ (240-37.440), destes pacientes 50% utilizaram sulfato de quinino, tetraciclina e primaquina, 25% usaram mefloquina e primaquina e 25% sulfato de quinino. A maioria dos casos foi por *Plasmodium vivax*, sendo a maioria tratada com cloroquina e primaquina. A média da parasitemia por *Plasmodium vivax* na forma de gametócito teve 11 parasitas/campo e de trofozoítas de 8,8 parasitas por campo. Tivemos 2 casos de infecção mista por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. No estudo, todos os casos tiveram sucesso após início da terapêutica adequada. **Conclusões:** O estudo mostrado mostra o perfil dos casos de malária de paciente que tiveram contato com áreas endêmicas, confirmando que certas profissões que necessariamente entram em contato com áreas de grande vegetação são mais propensas a adquirir a doença. O alto grau de eficácia do tratamento dos casos, mostram a importância do tratamento precoce dos casos suspeito. De certa forma, observamos a importância do levantamento epidemiológico para a compreensão do perfil dos pacientes atendidos em um hospital terciário localizado em área não endêmica.

**XXI ANNUAL MEETING
OF THE BRAZILIAN SOCIETY
OF PROTOZOOLOGY**

**XXXII ANNUAL MEETING
ON BASIC RESEARCH
IN CHAGAS' DISEASE**

**International Symposium on
Vesicle Trafficking
in Parasitic Protozoa**

**November 7-9 2005
Caxambu MG Brazil**

**sbpz@icb.usp.br
www.sbpz.org.br**



Epidemiologia - Epidemiology

EP01 - Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates from *Panstrongylus geniculatus* captured inside houses in rural area at the northeastern of Venezuela

FIGUERA LOURDES (IIBCA-UDO); MARCHÁN EDGAR (IIBCA-UDO); MARTÍNEZ CLARA (IMT-UCV); CARRASCO HERNÁN (IMT-UCV)

Chagas disease is a serious public health problem in Latin America (WHO Report, 1998). At northeastern of Venezuela in previous seroepidemiological study carried out in 2002 by active search in San Pedro, rural village, we found a high seroprevalence (26%) of Chagas disease associated to all age groups of people living in this area, predominantly in individuals younger than 20 years old (24%), suggesting an active transmission of the disease. In this sense in order to establish the presence and molecular typing of *Trypanosoma cruzi* parasites circulating in the region we carried out a capture of Triatomine bugs at houses where seropositives cases were detected between march-june of the present year. After taxonomic identification of Triatomine bugs, the insects were examined for the presence and isolation of parasites. RAPD and minixen analysis were applied for species identification and main group typing. 22 *Panstrongylus geniculatus* attracted by light were collected at San Pedro and 15 (68%) of them were found infected with *T. cruzi*. All the isolates were identified as corresponding to the Tc I or zimodeme 1 main group. These finding reveal a high infection index of *P. geniculatus* with *T. cruzi* and suggest changes in the pattern of behavior of this sylvatic specie of Triatomine bug, possibly associated with high seroprevalence of Chagas disease at San Pedro village.

EP02 - Phylogeny of Apicomplexa parasites and oomycetes, as detected by small ribosomal RNA sequences.

L.R.FERREIRA (IMTSP); D. PEREZ (CBM/IPEN); A.J.GALISTEO JR. (CBM/IPEN); H.F.ANDRÁDE JR. (IMTSP)

Apicomplexa parasites, as Plasmodium, Toxoplasma and Cryptosporidium, are highly prevalent intracellular pathogens presenting a characteristic apical complex, machinery for host cell invasion. Their cycle are complex, involving two parts, one asexual, with sporogonic division, including endodiogeny, and another sexual, involving gamete formation with meiosis and zygotes, usually in different host species. Recently, a non-photosynthetic chloroplast like organel, the apicoplast, was also described associated to specific amylopectin granules, chemically and structurally similar to those produced by red algae. These complex characteristics distinguish them from other parasitic protozoa, without sexual division, as Kinetoplastidae, resulting in

diverse origin and phylogeny. One interesting group of disseminated plant pathogens, the Oomycota, presented some similar intriguing features, as biflagellate gametes similar as apicomplexan microgametes, similar storage sugars, and also active plant cell invasion. Here, we compare the sequences of rRNAs of several organisms including Phytophthora, other oomycetes and several apicomplexa, looking for their phylogenetic distance. We recovered the published sequences in the GeneBank, using the software MegAlign 4.00 expert sequence analysis software (DNASTAR Inc.) with the ClustalV algorithm for alignment and dendrogram construction. The dendrogram of the 5S rRNA showed some clustering between oomycetes and Apicomplexan sequences, without including other tested Kinetoplastidae parasitic protozoa, similar to published reports analyzing tubulin genes. We also tested other sequences of complete large and small rRNAs with not so clear results. Our preliminary data argue for a common ancestor between Apicomplexa and Oomycota parasites, probably Algae, as the red algae elsewhere described. This evolution as parasitic agents was successful for the Apicomplexa, specially with the surge of complex metazoans, with intestinal tubes and large bodies. This diverse origin of parasitic protozoa could explain different susceptibility to therapeutic drugs and offers alternatives for prevention and control of those important parasitic diseases. Supported by LIMHC/FMUSP.

EP03 - TOXOPLASMOSIS SEROPREVALENCE IN SMALL AND LARGE CITIES IS NOT RELATED TO RURAL AND URBAN AREAS IN SÃO PAULO, BRAZIL

MARCIANO, M.A.M. (IMTSP); R.M. HIRAMOTO (IAL); M.S.MACRE (ICBUSP); T.A.C.SILVA (IAL); M.KAWARABAYASHI (IAL); H.F.ANDRÁDE JR. (IMTSP)

Toxoplasmosis is an widely distributed zoonoses in humans and animals, caused by an obligate intracellular parasite, Toxoplasma gondii. The disease is transmitted by ingestion of oocysts shed in cat stools or by cysts in undercooked meat. Usually, the transmission is also attributed to low sanitation, suggesting that people who live in rural areas, without sanitation, must have higher incidence of this disease. In the present study, we analyzed 133 samples from Pinhalzinho, São Paulo, a typical 15.000 hab small city in South-East Brazil, with a large rural population, comparing to the seroprevalence in 873 samples from a large urban ten million city, nearly without rural areas and adequate sanitation. The urban area of the small city presented good sanitation, with sewage system and treated water but people who live in rural areas presented only self promoted sanitation. We evaluated the seropositivity for toxoplasmosis in samples by IFI or using an in house IgG ELISA, with IFI checked standardization. Samples were divided by sex, or in ten years age groups, starting after adolescence. Results: The age-corrected prevalence was no gender difference in both cities, but was higher in the small city, over 75% after age 40, as

IM55 - Course of *Leishmania (L.) amazonensis* infection in deprived mice of IL-12 or of IFN- γ The Molecule CD28

TOMAS, L.S. (ICB-USP); LIMA, G.M.C.A. (ICB-USP)

It is accepted that IL-12 and IFN- γ are required for the leishmanicidal effect. Studies indicate that co-stimulatory signals is necessary to T cell proliferation and cytokine response. The purpose of this work is to investigate the infection by *L. amazonensis* in C57BL/6 mice deprived of co-stimulatory molecule CD28 knockout (KO), IL12 KO and IFN- γ KO as compared with the wild type (WT) controls. The mice were inoculated into the footpad with 10^5 or 10^6 stationary phase promastigotes and 10^3 metacyclic purified. The kinetics, parasitemia and cytokine production were monitored. We observed that CD28 KO mice developed controlled and smaller lesion in comparison to the other groups, independent of inoculum dose of parasites. The number of parasites in the footpad and popliteal draining LN was lower in CD28 KO mice inoculated with stationary phase promastigotes. When the mice were inoculated with metacyclic forms no difference was noted in the popliteal LN parasitic load in CD28 KO and WT mice, but in the footpad the parasite number was lower in the CD28 KO mice. The IL-10 production was significantly lower in the supernatant cells culture of draining LN from CD28 KO mice. Similar levels of IL-12 and IFN- γ were detected between CD28 KO mice and WT mice. IFN- γ KO and IL-12 KO mice were shown to be highly susceptible to the infection with severe and metastatic lesions and higher parasitemia. Taken together, these data suggested that molecule CD28 play a role in susceptibility to *L. amazonensis* infection and the presence of IL-12 and IFN- γ are essential to resistance. Supported by CAPES e-mail: lstoma@usp.br

IM56 - Characterization of immunological compartment and cytokines involved in host resistance to experimental infection with natural recombinant (type I/III) strains of *Toxoplasma gondii*

RESENDE, M.G. (CPqRR) FUX, B. (CPqRR); GAZZINELLI, R. T. (CPqRR); VITOR, R. W. A. (UFMG); ROGRIGUES, S. C. O. (UFMG); MELLO, M. N. (UFMG)

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular coccidian, belonging to the phylum Apicomplexa. The parasite can be found within many different species of mammals and birds (DUBEY & BEATTIE, 1988). In mice, the various strains of the parasite differ enormously in their virulence and disease presentation (HOWE & SIBLEY 1995). Some studies show that the structure of *T. gondii* population is clonal, being that most strains fall into one of the three categories denominated Type I, Type II and Type III lineages. The Type I lineage was shown to exclusively contain those strains that are highly virulent, whereas Type II and Type III strains

display lower virulence in mice (SIBLEY et al., 1992). We analyzed eight genetic markers and the biological behavior of two different recombinant strains of *Toxoplasma gondii*, D8 and G2 (I/III) in various lineages of mice in compares with ME49 (II) and P-Br (I/III). As previously shown for the ME-49 strain to confirm the importance of cytokines in host resistance to these strains, we used the IFN- γ , IL-12 - and iNOS - mice. All the strains presented low virulence in the acute phase of infection and were cystogenics during the chronic infection shown like type I/III. The C57BL/KsJ congenic strain containing MHC haplotype "d" was more resistant than the parental strains (C57BL/6), CB10H2 congenic strain containing MHC haplotype "b" were more susceptible than the parental strain (BALB/c) when infected with the ME-49, but not with the P-Br, D8 and G2 strain. These findings are relevant to understanding the complex immunologic mechanisms that protect against *T. gondii* infection.

IM57 - Analysis of the humoral response in BALB/c mice immunized with 255 Gy irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with cysts of ME49 strain

COSTA-SILVA, T. A. (IAL); GALISTEO, A. J. JR (IPEN); MEIRA, C. S. (IAL); PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. (IAL); ANDRADE JR, H. F. (IMT); HIRAMOTO, R. M. (IAL)

Toxoplasma gondii infection is usually asymptomatic in immunocompetent hosts, with occasional eye involvement. Toxoplasmosis can cause severe disease in fetus of acutely-infected pregnant woman, immunocompromised (AIDS) and therapeutically immune suppressed patients, as cancer or transplant recipients. At the moment, no effective vaccines against *T. gondii* are available for humans, and vaccines for the veterinary have been showing low efficiency. Susceptible C57BL/6j mice immunized with irradiated tachyzoites have been demonstrated immune response similar to the chronically infected mice, with significant decrease of the cysts in brain. In this work groups of resistant BALB/c mice were immunized with three sequential i.p. doses of 255 Gy RH strain-irradiated tachyzoites (1×10^7) using an uniform source of ^{60}Co -rays in a $\gamma\text{Cell}^{\text{TM}}$. The mice groups were challenged after 18 days from the last dose with 10 cysts of Me49 strain by oral route. Blood samples from the tail vessel were collected weekly in standardized filter paper, stored in freezer and the IgG antibody detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Specific antibody response showed an increase in IgG levels after the immunization with irradiated tachyzoites. After challenging with Me49 strain cysts, immunized mice presented high levels of IgG antibodies as compared with control group and no detectable cysts in brains were observed by light microscopy. These results were different from immunized C57BL/6j mice, where a decrease in number of cysts was found. These results show that the immunization can induce an increase of the humoral response and can prevent cysts forming in BALB/c mice.

**XX ANNUAL MEETING
OF THE BRAZILIAN SOCIETY
OF PROTOZOOLOGY**

**XXXI ANNUAL MEETING
ON BASIC RESEARCH
IN CHAGAS' DISEASE**

November 8 -10 2004 Caxambu MG Brazil

TOPICS

**Biochemistry Chemotherapy
Vaccine Development
Evolution Epidemiology
Vector Control
Gene Expression
Cell Biology
Immunology
Genomics**



**sbpz@icb.usp.br
<http://www.sbpz.org.br>**

EP06 - PREVALENCE OF MARKERS OF *Leishmania chagasi* VISCERAL INFECTION AND DISEASE EXPRESSION IN HUMANS AND DOGS IN A RURAL ENDEMIC AREA (MUNICIPALITY OF PANCAS, ESPÍRITO SANTO, BRAZIL)

FALQUETO A, FERREIRA AL
 UFES-Universidade Federal do Espírito Santo
 PORROZZI R, TEVA A, SANTOS DA COSTA M.V.
 FIOCRUZ-Instituto Oswaldo Cruz
 SANTOS C.B., KIEFER D.
 UFES-Universidade Federal do Espírito Santo
 GRIMALDI JR. G.
 FIOCRUZ-Instituto Oswaldo Cruz

Here we study the extent of cryptic *L. chagasi* visceral infection in both human and dogs in order to provide a basis for future interventions which could assist in the control of the disease. Sera sampled from 189 humans and 112 dogs living in four rural locations (São Luiz I, Palmital, Roque, and Uba creeks) in an endemic area (Pancas, ES) were analyzed by ELISA and IFA as screening tests. The overall prevalence of *Leishmania* antibodies (ELISA) in the human population was 40% (76/189). Of the 177 individuals skin tested with leishmanin, 92 (52%) had indurations major/equal than 5 mm after 48-72 h. There was evidence of long subclinical latency with no smoldering disease in the seropositive cases. The overall prevalence of specific antibodies (ELISA) in the dog population was 62% (69/112), but the seroprevalences were highly variable in the different localities, ranging from 45 percent (Palmital) to 85% (Uba). The high sensitivity of ELISA contrasts with the low sensitivity (14.6%; 15/103) obtained by IFA (in this case, examining dog blood collected on filter paper). Problems in determining the specificity of serology will be discussed. Seropositive dogs also developed signs of early VL. These data confirm the continuing occurrence of transmission in humans in the state, indicating that the control programs probably fail because of (1) high incidence of infected dogs and (2) time delays between diagnosis and culling. Prevention of disease in dogs by immunization would be the best approach to control the transmission cycle of zoonotic VL. Supported by grants from FIOCRUZ, PRONEX-CNPq and FAPERJ (BRAZIL).

EP07 - Quantitative *Toxoplasma gondii* oocyst detection by a modified Kato Katz test, using Kynioun staining (KKK), as compared to qualitative sugar flotation techniques in ME49 strain experimentally infected cats

TSUTSUI, V.S.
 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP
 MEIRELES, L.R., CARMO, C.V.
 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
 GALISTEO JR, A.J.
 IPEN-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

HIRAMOTO, R.M.
 Instituto Adolfo Lutz

TERENTOWICZ, H.C.K., BRAZ L.M.A., ANDRADE JR., H.F.
 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

Toxoplasmosis is a disease caused by *Toxoplasma gondii*, an obligated intracellular parasite worldwide spread, capable of infecting all warm blooded animals. Felidae are the definitive hosts, with enteric epithelial multiplication with subsequent sexual stages and oocyst production. All cats are susceptible, regardless of age, sex and breed, shedding oocysts to the environment through feces. We compared two techniques for oocysts detection in feces of experimentally infected cats, using a qualitative sugar flotation and a Kato Katz approach using subsequent Kynioun staining. Animals serologically negative to *T. gondii* received by gavage 5×10^2 mice brain cysts of ME49 strain of *T. gondii*. Feces were daily collected from the 3th to the 30th day post-inoculation (p.i.). Oocysts were detected by two methods, the classic qualitative sugar flotation, as standard, and the modified Kato Katz stained by Kynioun (KKK). Briefly, 40 ml of nylon filtered stools were placed on microscope slide in a Kato well, with a relatively thin smear obtained by sliding over another slide. Both slides were dried and stained by classical Kynioun method and observed in optical microscopy. *T. gondii* oocysts appeared red, with preservation of internal details. In the experimentally infected cats, oocysts were detected from 7th to 15th day through flotation technique and KKK showed oocysts from 6th to 16th day, being more sensitive for a larger period, with permanent documentation. KKK also allowed semi quantitative estimation of oocysts per grama of feces, showing that the peak of excretion occurred in the 8th to 11th days after challenge. KKK also showed the advantage of a fewer feces manipulation, decreasing the possibility of environment and operator contamination. Those advantages suggest that this modified technique could be introduced in the search of oocysts excretion in feces of suspected animals. This work was supported by LIMHCFMUSP49, CAPES and CNPQ.

EP08 - Incidence of giardiasis in the Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro) for one year

MENESES VF
 FIOCRUZ - ENSP
 CARDOSO FO
 FIOCRUZ-Instituto Oswaldo Cruz

Giardiasis, an intestinal protozoan infection caused by *Giardia intestinalis* is a most common human protozoal infection. This fact can be understood, because the faecal-oral transmission incidence of giardiasis is related to bad sanitary conditions. In the tropics, this spread must be quite direct because *Giardia* cysts are not extraordinarily resistant either to heat or drying. Although more common where hygiene leaves most to be desired, *Giardia* infections remain a problem in industrialized countries, where the prevalence rate is 2-5%. The disease is mainly characterized by gastrointestinal symptoms. In the present study, the incidence of the giardiasis was determined for 1 year from August 1,

IM09 - A RECOMBINANT CYSTEINE PROTEINASE FROM *LEISHMANIA (L.) CHAGASI* IMPLICATED TO DOG T CELL RESPONSES.

PINHEIRO, P.H.C.

Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí

DIAS, S.S.

UNIFESP-Escola Paulista de Medicina

EULÁLIO, K.D., MENDONÇA, I.L.

UFPI-Universidade Federal do Piauí

KATZ, S., BARBIÉRI, C.L.

UNIFESP-Escola Paulista de Medicina

The present work evaluates the lymphoproliferative responses elicited by a recombinant protein produced by expression of the gene encoding a cysteine proteinase of 30 kDa from *Leishmania (L.) chagasi*, rLdcccys1. These responses were determined in peripheral blood mononuclear lymphocytes from naturally infected dogs presenting several clinical signs, living in Teresina, the capital of the Piauí state, Brazil, an endemic region of visceral leishmaniasis. The recombinant antigen elicited higher T lymphocyte responses in dogs presenting asymptomatic and oligosymptomatic visceral leishmaniasis compared to those observed in symptomatic animals. Lymphokine analysis showed a predominance of IFN- γ in the lymphocyte supernatants from asymptomatic dogs, whereas lymphocytes from symptomatic animals released significant levels of IL-4 and IL-10. Intermediary values of IFN- γ and IL-10 were observed in lymphocyte supernatants from oligosymptomatic patients. A correlation between oxide nitric release and IFN- γ secretion was also observed in the supernatants of dog lymphocytes stimulated by rLdcccys1. These results show that the recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (L.) chagasi* is able to induce and discriminate cellular responses in dogs naturally infected with *Leishmania (L.) chagasi*, opening perspectives to test this recombinant antigen in protection studies in endemic regions of canine visceral leishmaniasis. Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP and Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí-NOVAFAP.

IM10 - Oral immunization with irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii*: Analysis of IgG subclasses in serum and brain histopathology in immunized C57BL/6j mice

GALISTEO JR., A.J.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

HIRAMOTO, R.M.

Instituto Adolfo Lutz

CARMO, C.V.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

BAPTISTA, J.A.

IPEN-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

ANDRADE JR., H.F.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

Toxoplasmosis, a prevalent widespread infection in man and animals, occurs mainly through ingestion of water and food contaminated with oocyst from cat feces. There is no vaccine but radiation sterilized tachyzoites (RST) parenterally administered induced significant protection. We study RST by oral route, looking for serum IgG subclasses and quantitative protection studies. RST was RH strain tachyzoites irradiated with 255Gy and stored in liquid nitrogen. Mice were immunized biweekly with 10^7 RST by oral route, suspended in milk and/or aluminum hydroxide. Specific ELISA for IgG1, IgG2a and IgG2b detection was performed in weekly blood samples during and after immunization, with challenge with 10 cysts of ME49 strain p.o. Protection was determined at the 30th day in brain by cyst counting and histological analysis. Parenterally immunized and infected animals presented high levels of all IgG subclasses. P.O. immunized groups presented low levels of IgG2b, similar to controls, but the other isotypes were easily detected in all groups. When challenged, all immunized groups presented low levels of cysts in brains, but without death or clinical signs. All mice immunized presented significant protection, compared to controls (P0.001), with better protection i.p. and aluminum hydroxide groups. Other protocols provided partial protection (P0,05) with less 500 cysts than controls, with confirmation by brain histology. The best protection was related to low levels of serum IgG2a, reported as a marker of Th1 immune response. The effect of aluminum hydroxide was could be related to a buffering effect in gastric juice, allowing RST survival, while milk association can be insufficient to block the peptic digestion or competition among milk protein and *T.gondii* antigens. All these data provide insights in oral immunization schedules for toxoplasmosis prevention, allowing new studies that could results immunizing baits for widespread environmental vaccination of free living animals.

This work was supported by FAPESP (99/04926-6), LIMHCFMUSP-49, CNPq and CAPES

IM11 - Laboratory artificial lethal challenge could induce misinterpretation of the protection induced by *Toxoplasma* vaccines

TERENTOWICZ, H.C.K.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

HIRAMOTO, R.M.

Instituto Adolfo Lutz

GALISTEO JR., A.J., MEIRELES, L.R., TSUTSUI, V.S., CARMO, V.L., HEITOR FRANCO DE ANDRADE JR.
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

Toxoplasmosis is mostly asymptomatic in humans and animals, but 1% suffers with eye involvement and visual losses, with deaths in immuno-compromised people and in fetuses when acute disease occurs during pregnancy. There is no commercial vaccine for human toxoplasmosis, with several reports using recombinant proteins, parasite purified proteins or radiation sterilized parasites (RST). The latter presented good results, similar to chronic disease, with low cysts counts in brains of immunized mice in natural infection models, but shows feeble protection against huge artificial challenges with RH tachyzoites. We study the quantitative protection in-

duced by ET against artificial lethal load of cysts. Tachyzoites of RH strain was sterilized with 255Gy (60-cobalt) radiation and groups of C57Bl/6j mice were immunized (i.p.) with three doses of 10^7 RST at biweekly intervals. A significant increase of antibody anti-*T.gondii* was detected after three doses. Those animals were challenged (v.o.) with 100 ME-49 cysts. All control mice died after two weeks of the challenge, but immunized mice presented a lower mortality (40%) with all survivors presenting cysts in brains. Brain cyst counts were similar to those found in brains of mice challenged with 10 cysts by oral route (a non lethal dose). Those data shows that the immunization with RST results in a protective effect that could be insufficient for artificial challenge, that exceed the immune response capacity to control a parasite. Careful choice of the challenge must be as similar as possible to natural infection, avoiding artificial huge loads, easily obtained at laboratory level. All efforts must be performed in order to quantify the infection in animals. The vaccine testing design must include several approaches of experimental infections, allowing critical evaluation of their results, avoiding misinterpretation of failures of promising candidates.

This work was supported by LIMHCFMUSP-49, CAPES and CNPq(141404/2004-3).

IM12 - Lymphoproliferative response of *Leishmania (L.) chagasi* experimentally infected dogs of an immunotherapy assay with Leishmune^R vaccine.

MENDES CO, SANTOS FN, BORJA-CABRERA GP

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ
NOGUEIRA R

Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Imunologia, RJ
PALATNIK DE SOUSA CB

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ

The immunotherapeutic effect of FML-QuilA or FML-saponin R vaccines was recently proven against experimental and natural canine leishmaniasis. A strong protective response was obtained with positive DTH, normal levels of CD4+ T cells and CD21+ B cells, high levels of CD8+ lymphocytes and absence of parasite in bone marrow. At day 150, antibodies were detected in the FMLELISA assays of all dog samples. In the present work, we analyzed the T-cell reactivity to leishmanial antigens of 25 dogs infected with 2×10^8 amastigotes of *Leishmania (L.) chagasi*. The lymphoproliferative response (LPR) of PBMC was performed at day 180 (before vaccination). PBMC were separated over a Ficoll-hypaque gradient. The cells (4×10^5 per well) were stimulated with f/t lysate of stationary phase (10^6 promastigotes per well) of *L. (L.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) donovani* and incubated at 37°C, 5% CO₂ for days. Sixteen hours before harvesting, 1 μ Ci of [³H], and the radioactivity uptake was measured in a scintillation Beta-counter. All dogs showed positive responses for the three antigens: mean averages $\pm$ SD (stimulation index): *L. (L.) braziliensis* (2.27 ± 4.57), *L. (L.) chagasi* and (4.61 ± 14.70) and *L. (L.) donovani* (3.63 ± 13.63). However, 15 dogs developed their highest response against *L. (L.) chagasi*, 5 dogs against *L. (L.) braziliensis* and 3 dogs against *L. (L.) donovani* suggesting a mild species-specificity recognition. The analysis of the

proliferative response of vaccinates versus control animals in now in progress.

Support: CNPQ; FAPERJ; RHAECNPQ; FIOCRUZ, Fort Dodge Animal Health Brazil and USA.

IM13 - Phase I safety and immunogenicity trial of Leishmune^R in dogs of an endemic area

BORJA CABRERA GP, PARAGUAI DE SOUZA E, MENDES

CO, CASAS CP, SANTOS FN

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ

OKADA LYH, TRIVELLATO FAA

Clínica Veterinária Cães e Gatos, Araçatuba - SP

MENZ I

Fort Dodge Saude Animal, SP

PALATNIK DE SOUSA CB

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ

A group of 482 asymptomatic dogs from São Paulo and Minas Gerais endemic areas of canine visceral leishmaniasis was vaccinated with Leishmune^R (1.5mg of FML and 0.5mg of Saponin R). Animals received three sc doses with 20-30 days intervals and one annual boost. For ethical reasons, veterinarians were not able to keep a control population of untreated and exposed dog. With the aim of comparison then, we also show the data collected from a control exposed dog population of Jardim Progresso, Natal, RN, Brazil where human and canine kala-azar is also endemic. Among 482 vaccinated dogs only 432 were seronegative in the FMLELISA assay at D0 and asymptomatic. Strong seroconversion was detected after complete vaccination (98.2%). By this time, only 15% of the controls developed anti-FML antibodies. Regarding the clinical development of the disease, at month 7 after vaccination, only 0.92% of the vaccinated dogs showed clinical or parasitological signs of kala-azar while 5.44% of the untreated controls showed kala-azar symptoms ($\chi^2 = 149.44$; $p < 0.001$). This difference could be even more pronounced since the untreated controls are submitted to regular serological epidemiological survey which removes for sacrifice the seropositive reservoirs. Also at month 7, the intradermal reaction of vaccinees was positive in 59% of the animals. At month 9, differences between vaccinees and controls are more pronounced. Indeed, while no kala-azar obits were found among vaccinees, 7% of serologically and clinically confirmed and 8% of clinically suggestive obits were scored in the control group ($p < 0.001$). Also, 13% of symptomatic cases were detected among controls and only 2.4% among vaccinees ($p < 0.001$). Our results indicate the strong protective prophylactic effect of Leishmune^R in seronegative dogs of endemic areas. The Leishmune^R industrial vaccine reproduces the previously reported protective effect of the FML saponin vaccine. Support: CNPQ; FAPERJ; RHAECNPQ; Fort Dodge Animal Health Brazil and USA.

and cultured with DMEM-F12 for 24h. Tachyzoites (RH strain) were obtained by peritoneal washes of infected mice. Interactions were performed for 2h in a 10 to 1 *T. gondii* macrophage ratio and cells were further cultured. Supernatants after 24 and 48h were assayed for the presence of NO that was inhibited by 40 percent after infection. Infected HD11 presented increased expression of Smad 2 and phosphorylated Smad 2 was translocated to the nucleus. These results indicate that TGF-beta might be involved in the evasion mechanism of *T. gondii* in chicken macrophages.

Supported: FAPERJ, MCT/CNPq

IM30 - Oral infection with *T.gondii* specifically elicits CXCL12 production in Peyer patches but not in spleen, as related to TGF β , in experimentally infected mice

HERMIDA, F.P.M., VIEIRA, D.P., GALISTEO JR., A.J., DE ANDRADE JR., H.F.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

CXCL12 is a chemokine responsible for leukocyte chemotraction to sites of infection and is produced by mesenchimal or stromal cells present mainly in endothelial tissues. Presence of CXCL12 may also indicate anti-apoptotic processes, conflicting to the presence of TGF β , a marker of lymphocyte apoptosis, which inhibits activity of macrophages, resulting in Th2 immune response. These products, TGF β and CXCL12, could interact in adaptive immune response, especially in the function of discrete cells populations, such as APCs. There are few studies about functions of these molecules in enteric infections. We study the production of TGF β and CXCL12 by a SemiQuantitative RTPCR assay in Peyer patches and spleen of experimentally infected mice. Lymphocytes from Peyer patches and spleen were obtained from control mice or after 30day oral infection with 10 cysts of ME49 strain. Organs were aseptically removed and conserved in TriZOL. RNA obtained after extraction was transcribed to cDNA using MMLV reverse transcriptase and OligodT primers. cDNA were amplified by PCR using specific primers for CXCL12, TGF β and β actin sequences, with resolution of fragments in silverstained PAGE. After digitalization, quantitative data was obtained using artificial optical density using the ImageJ freeware. Results were estimated as percent of β actin production. In spleen, there is a good positive relationship between CXCL12 and TGF β production, absent in normal Peyer patches, with low CXCL12 production. Enteric toxoplasmosis induces a substantial increase in CXCL12 production in Peyer patches, with levels similar to spleen production. We also showed that infection slightly increases expression levels of the two cytokines. Increase of CXCL12 expression could be related to homing effect of APC in the Peyer patches, resulting in immune response or tissue regeneration after enteritis caused by *T.gondii* RH infection, but antigen stimulation must be confirm the exact effect and the cells involved in these processes. Financial support: CNPq, LIMHCFMUSP49 and FAPESP (99/04926-6).

IM31 - Immunization with *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase increases the pathogenesis of experimental chronic

JULIANA SENRA

Centro de Pesquisas gonçalo Moniz-FIOCRUZ

JOSÉ RONNIE VASCONCELOS

UNIFESP-Escola Paulista de Medicina

SIMONE GARCIA, RICARDO RIBEIRO-DOS-SANTOS

Centro de Pesquisas gonçalo Moniz-FIOCRUZ

MAURÍCIO M. RODRIGUES

UNIFESP-Escola Paulista de Medicina

MILENA B. P. SOARES

Centro de Pesquisas gonçalo Moniz-FIOCRUZ

Chagas' disease is an important health problem in Latin American countries, where it is estimated that about 18 million people are affected. The mechanisms leading to the development of chronic chagasic cardiomyopathy (CChC), the most common symptomatic form of the disease, are unknown. In this work we investigated whether the immunization with trans-sialidase (TS), an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen affects the development of chronic myocarditis in a mouse model of infection. Three weeks after the last dose, mice were challenged with 100 trypomastigotes of *T. cruzi* Colombian strain. Groups of mice were sacrificed in the acute and chronic phase of infection for histologic examination of hearts and blood was collected for detection of anti-TS antibodies by ELISA. Naked DNA immunization with a plasmid containing the catalytic domain of TS alone or in combination with recombinant TS immunization induced the production of high levels of anti-TS antibodies and IFN-gamma production, but did not affect the control of parasitemia during the acute phase of infection with Colombian strain *T. cruzi*. However, mice immunized with TS prior to infection developed a more intense myocarditis 4 months after infection, compared to control mice. At this timepoint of infection, spleen cells from TS-immunized mice produced higher IFN-gamma levels when compared with controls. Although there were no significant differences on myocarditis between immunized and control groups after 7-8 months of infection, mice previously sensitized with TS had significantly more severe cardiac conduction disturbances in electrocardiographical analysis compared to infected controls, such as intraventricular conduction disturbances, atrium-ventricular blocks and extrasystoles. Our results indicate that immune responses against *T. cruzi* trans-sialidase influence or participate in the pathogenesis of chagasic myocarditis.

Financial support: FIOCRUZ, FAPESP.

IM32 - Comparison of immunological and inflammatory responses after Colombian strain *Trypanosoma cruzi* infection of mice with different genetic backgrounds

CAROLINA DE O. RAMOS

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ
JULIANA F. V. SENRA, RICARDO SANTANA DE LIMA

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

MAURÍCIO M. RODRIGUES

UNIFESP-Escola Paulista de Medicina

MILENA B. P. SOARES

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

RICARDO RIBEIRO DOS SANTOS

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ

The pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy (CChC), the most severe form of Chagas' disease, are yet to be disclosed. This disease constitutes an important health problem in Latin America, where about 18 million people are infected by *Trypanosoma cruzi*. The development of CChC may be related to events occurring in the acute phase of infection. Here we compared the immune and pathological responses of isogenic strains of mice infected with Colombian strain *T. cruzi*. Mice of A strain were highly susceptible to *T. cruzi* infection, with high parasitemia and mortality when compared to BALB/c and C57BL/6 mice. In the chronic phase, BALB/c mice developed more intense myocarditis and fibrosis compared to C57BL/6 mice. During the acute phase, a severe inflammatory reaction was detected in the hearts of mice from the 3 strains, although a higher inflammatory response and parasitism was observed in hearts of mice from A strain when compared to the other strains. Mice of A strain also had lower levels of IFN- γ , IL-4 and IL-10 in cardiac tissue than mice of BALB/c and C57BL/6 strains. In the acute phase of infection, serum titers of anti-*T. cruzi* IgG1 and IgG2a antibodies were significantly higher in mice of BALB/c and A strains compared to mice of C57BL/6 strain. Similar results were obtained regarding trans-sialidase specific antibodies. A strain mice had a predominance of IgG2a over IgG1 antibodies, whereas BALB/c mice had the opposite. BALB/c mice also had significantly higher levels of *T. cruzi*-specific antibodies than C57BL/6 mice during the chronic phase of infection. The results indicate that anti-*T. cruzi* antibody production does not correlate with resistance to infection. The influence of this humoral immune response, as well as of other immunological parameters on the development of CChC, is being investigated.

Financial support: FIOCRUZ, FAPESP and NIH.

IM33 - Bone Marrow Transplantation versus Stem Cell Mobilization with G-CSF in a Mouse Model of Chronic Chagasic Cardiomyopathy: A Pilot Study

LEONARDO L. ROCHA, RICARDO S. LIMA, SIMONE GARCIA, JULIANA F. V. SENRA, SHEILLA A. DE OLIVEIRA, MILENA B. P. SOARES, RICARDO RIBEIRO-DOS-SANTOS
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Chagas' disease, caused by the *Trypanosoma cruzi* protozoan, is a major health problem in Latin America. Hematopoietic stem cells have come to focus due to their ability to transdifferentiate into different cell types. In experimental Chagas' disease, transplantation of bone marrow cells caused a decrease in fibrosis and inflammation in Chronic Chagasic Cardiomyopathy (CChC). The aim of this study was to compare direct bone marrow cell injection versus peripheral mobilization with G-CSF as treatment for CChC. Female C57BL/6 mice were infected with Colombian strain *T. cruzi* trypomastigotes and parasitemia was evaluated to confirm infection. Eight months after infection, animals were splenectomized and 2 months later divided into three groups as follow: (A) BMT: injected with 4×10^7 mononuclear BM cells from male C57BL/6 EGFP transgenic mice per intravenous route; (B) G-CSF: treated with G-CSF (filgrastim) 200 $\mu\text{g/kg/day}$ IP for five days in two cycles with an interval of 7 days; (C) Infected control: injected with saline. Animals were sacrificed 75 days after treatment regimen. Electrocardiogram evaluations were performed before and 30 and 60 days after treatment. All animals had the same severity of cardiac conduction disturbances prior to treatment. Either in BMT and G-CSF group we could observe cardiac electrical activity improvement in 30 and 60 days after therapy. The hearts were fixed and stained with hematoxylin and eosin or Masson's trichrome to determine percentage of inflammation and fibrosis respectively. In this experiment there was a reduction in fibrosis and inflammation in both treated groups. EGFP+ myocytes and vessels were present in BMT group as demonstrated by confocal microscopy. Fluorescent in situ hybridization of Y+ chromosome confirmed the presence of these cells in treated hearts with BMT. These data suggest that G-CSF treatment may be an alternative approach to BMT in CChC. More investigation, however, is needed to clarify this issue.

Financial support: IMBT, CNPq, FIOCRUZ and FAPESP

IM34 - IMMUNOGLOBULIN G AVIDITY IN DIAGNOSIS OF ANIMAL TOXOPLASMOSIS

LUCIANA REGINA MEIRELES

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

VINÍCIUS TSUTSUI

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

CLAUDIA VILLANO DO CARMO

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

ANDRÉS JIMENEZ GALISTEO

IPEN-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
TERENTOWICZ, H. C. K

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP
HIRAMOTO, R. M

Instituto Adolfo Lutz

CARDOSO, R. P. A., ANDRADE JR., H. F.

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

Toxoplasma gondii, worldwide highly infective protozoan parasite, infects humans and animals, with economic losses by fetal infection and abortion in veterinary medicine, related to acute or recent infections. Diagnostic serology for anti-*T. gondii* IgG does not discriminate between acute and chronic infections. The selection of high affinity B cell clones

during the immune response induces increasing immunoglobulin avidity, which could be predictive factor of infection period. Despite its usefulness, there are few reports on their use in veterinary medicine. In this study, we measure *T. gondii* IgG avidity in experimentally infected cattle, sheep, rabbit, cat and dogs. Groups of at least 4 animals were infected and peripheric blood cells (PBC) were obtained before and during acute and chronic infection. Cyst was detected in 6 weeks or 6 months after infection by B1 gene PCR. Avidity IgG ELISA was calculated by several approaches using both single serum dilution or serial dilutions and titers (AVT), using 6M urea elution. Avidity was effective in predicting infection period in all species, but diverse efficiency was observed in each species or determination method. The speed of avidity maturation is affected by the corporal mass of the infected animals or their susceptibility to the agent. PBC proliferation induced by the antigen corroborate that the avidity is dependent of cell selection. There are no relationship between antibody titers and tissue cysts, as demonstrated by PCR. Cysts were more frequent in recent six weeks infections as compared to chronic animals. In cats, the excretion of oocysts in the feces occurred very early in the infection, with low avidity antibodies. This fact could suggest that the presence of antibodies interferes with the production of oocysts. All those data shows the importance of IgG avidity in veterinary toxoplasmosis, a powerful tool for the temporal diagnosis of this zoonosis. This work was supported by LIMHCFMUSP - 49, CAPES, CNPQ.

IM35 - Opsonization of amastigotes impair nitric oxide production by activated macrophages in the presence of an adjuvant

CÔRTEZ, DF, SANTOS, LM, VIEIRA, LQ
UFMG-Universidade Federal de Minas Gerais

In C57BL/6 mice, *L. amazonensis* causes a chronic lesion which does not heal, while infection of the same mouse strain with *L. major* is self-healing. This difference in behavior between the two parasites seems to be caused by a smaller inflammatory response to *L. amazonensis*. In order to achieve healing of this infection, vaccination with *Leishvacina* (Biobrás, Montes Claros, MG) together with the adjuvant *Corynebacterium parvum* has been performed. Our studies have revealed that, in spite of a significant decrease in lesion sizes and increase in IFN- γ production, vaccination fails to completely protect C57BL/6 mice from infection with *L. amazonensis*. In fact, the number of parasites per gram of tissue is not different between vaccinated and control mice. When serial dilutions of the whole lesion was performed, the difference of the estimated number of parasites was only of one order of magnitude. Hence, we decided to investigate the effect of *L. amazonensis* antigens, adjuvant and the incubation of parasites with normal mouse serum in the capacity of IFN- γ -activated macrophages to make nitric oxide (NO) in response to *L. amazonensis* or *L. major* amastigotes. Activated macrophages respond with lower levels of NO when infected with *L. amazonensis* amastigotes when compared to *L. major*. *C. parvum* and parasite antigens

induced high amounts of NO, which were not increased by amastigotes. However, when amastigotes were pre-incubated with normal mouse serum, the production of NO by activated macrophages in the presence of *C. parvum* was completely abrogated. We hypothesize that, although *C. parvum* increases the production of IFN- γ in vaccinated mice, the capacity of macrophages to produce NO and therefore kill *Leishmania* may be impaired by factors in serum which bind to amastigotes.

IM36 - IgG ISOTYPES TO PLASMODIUM VIVAX APICAL MEMBRANE ANTIGEN-1 (PvAMA-1) IN SUBJECTS EXPOSED TO MALARIA IN BRAZIL

MORAIS, CG
Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG
FONTES, CJF
Departamento de Clínica Médica, UFMT
SOARES, IS
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
FCF/USP
BRAGA, EM
Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG

The Apical Membrane Antigen-1 of *Plasmodium* species (AMA-1) has been characterized as target for protection and as a possible malaria vaccine due to the restrict polymorphism presented and its role in the erythrocyte invasion. Malaria in the Brazilian Amazon is hypo- to mesoendemic with unstable transmission and the *Plasmodium vivax* is the prevalent species. Thus, the association of exposure to malaria transmission and IgG isotype to AMA-1 of *Plasmodium vivax* (PvAMA-1) was examined. For this purpose, we selected two distinct groups of subjects who had been exposed to different malaria transmission in Brazil, reporting one single *P. vivax* malaria episode ($n=59$) or more than ten previous episodes by *P. vivax* and/or *P. falciparum* ($n=117$). Recombinant protein which represents the PvAMA-1 was used in ELISA to measure the subclasses Index of Reactivity (IR) and their frequencies. A higher number of sera (89%) from subjects who experienced more than ten malaria episodes was IgG positive as compared to those with a single *P. vivax* episode (59%). The IgG IR were also significantly higher in individuals constant exposed ($IR=3.79\pm2.38$) than individuals who reported one previous malaria ($IR=1.54\pm1.30$) ($p<0.001$). The IgG1 was the prevalent isotype and its frequency and IR were also significantly higher in individuals straight exposed compared to the short-term exposed individuals. The IgG2, IgG3 and IgG4 frequencies to PvAMA-1 were similar (approximately 30%) for subjects comprising the two groups. However, the IgG3 IR was significantly higher in individuals constant exposed (up to 2.3). Our results suggested a correlation between exposure to malaria and high levels of IgG1 and IgG3 anti-PvAMA-1 in areas of unstable transmission in Brazil. Financial support: FAPEMIG/CNPq

IM47 - Analysis of the humoral response and protection induced in C57Bl/6j mice immunized with irradiated *Toxoplasma gondii* tachyzoites challenged with VEG strain

HIRAMOTO, R.M.
Instituto Adolfo Lutz

TERENTOWICZ, H.C.K., MEIRELES, L.R., GALISTEO JR., A.J., CARMO, C.V., TSUTSUI, V.S., ANDRADE JR., H.F.
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP

Toxoplasmosis, usually benign protozoan disease, leads to ocular lesions in normal individuals or severe disease in immunocompromised ones, with brain lesions and death. Fetal infection is also severe and debilitating and occurs in the acute infection of pregnant women. The same diseases could occur in farm animals, with abortion and economic losses. The available vaccine for sheep does not induce complete protection, similar to several experimental protocols, using thermo sensitive strains or recombinant proteins. Radiation sterilized tachyzoites (RST) could be an alternative, as when used for immunization in mice, they induced expressive decrease of cysts formation in Type II virulent strains challenge and a partial protection against type I lethal challenge, with immunity similar to chronic infection. There are few strains of *T.gondii* circulating in the world and a vaccine candidate must protect against the main 03 infecting strains. To test this fact, C57Bl/6j mice were immunized with three doses of RST biweekly by intraperitoneal route (i.p.). After two weeks, these mice were challenged with 10 cysts of type III *T.gondii* (VEG) by oral route. Tail blood was collected weekly in standardized filter papers and stored at in freezer. ELISA detected the presence and avidity of IgG antibodies. There were no deaths both in immunized and control mice groups, with gradual increase in IgG antibodies level after immunization with 3 doses of RST. After cyst challenge, there was a significant increase of the antibodies levels and in the avidity maturation of these antibodies. After three months of challenge, all mice were killed, with counts of total brain cysts. The immunized mice presented reduced brain cysts counts when compared with infected mice, showing that RST produced with type I RH strain parasites also promotes the immunity against type III VEG cysts, but more efforts are need towards a sterilizing vaccine. This work was supported by LIMHCFMUSP49, CAPES and CNPq.

IM48 - Canine Visceral Leishmaniasis: evaluation of the chronic inflammatory reaction and parasitism load in skin tissues of dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*

WANDERSON GERALDO DE LIMA
UFMG-Instituto de Ciências Biológicas
MÁRCIA ROSA DE OLIVEIRA
UFPb-Universidade Federal da Paraíba
LUCIENE SIMOES ASSIS
UFMG-Faculdade de Medicina

MARCELO VIDGAL CALIARI, WASHINGTON LUIZ TAFURI, WAGNER LUIZ TAFURI
UFMG-Instituto de Ciências Biológicas

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a severe systemic disease caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. In Latin America dogs are considered the principal domestic reservoir host to the human disease. CVL is mainly characterized by a high frequency of skin lesions. The histopathological picture of these lesions is presented by a chronic inflammatory reaction associated to a variable parasitism tissue load. The aim this work is to evaluate a number of inflammatory cells in ear, nose and abdominal fragments skin of asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic mongrel dogs. These data was correlated to the parasitism tissue load. Animals from Belo Horizonte, MG and João Pessoa, PB, Brazil, were sacrificed with lethal dose of Sodic Thiopental (33 percent). Skin fragments of ear, nose e abdomen were collected after necropsy, fixed in buffer formalin. The skin tissue sections were dehydrated, cleared, embedded in paraffin for histopathological (HE) and immunohistochemical analysis. Skin cut sections stained by HE were used to quantify the number of inflammatory cells. It was accessed in a morphometrical analysis in a Zeiss Imaging Processing Software (KS300) using sequential steps in a KS300 macro as describe by Maltos et. al (2004). The streptavidin-peroxidase immunohistochemistry method was carried out for amastigotes detection in all skin paraffined tissue. Immunolabeled amastigotes were quantified by morphometrical analysis using the KS300 software. Our results have been demonstrated higher numbers of inflammatory cells in ear skin tissue fragments. In general, asymptomatic dogs showed similar number of inflammatory cells than control animals. Symptomatic dogs group showed higher numbers of inflammatory cells in all skin tissue fragments (statistical significance in ear and nose). However, the parasitism in all skin fragments tissues of all clinical defined animals was not correlated to the cellular exudate quantification.

Supported by FAPEMIG, CNPq, UFMG

IM49 - Parotid, mandibular and cervical lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: a histopathological and immunocytochemistry study and its correlation with head skin lesions

MIRIAM MARIA SILVA COSTA, WANDERSON GERALDO LIMA, FERNANDA NOBRE DO AMARAL, WASHINGTON LUIZ TAFURI, WAGNER LUIZ TAFURI
UFMG-Instituto de Ciências Biológicas

Lymphadenomegaly and skin abnormalities are common clinical signs findings of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL). The aim of this study was to evaluate the histopathology, tissue parasitism load of lymph nodes (cervical, mandibular and parotid) and skins tissue sections of the external nose and external ear. Twenty-eight mongrel dogs were obtained from the City Hall Zoonosis Department of Belo Horizonte, MG, Brazil. Twenty-two naturally infected dogs with serological positive exams to *Leishmania* (IFAT - Titles up 1:40; and ELISA) were classified in two different groups: dogs with

ABSTRACT

***Toxoplasma gondii* vs ionizing radiation: Cell and humoral immunity in spleen and gut of isogenic mice immunized with ^{60}Co irradiated tachyzoites.**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

We are developing a vaccine for toxoplasmosis, using ionizing radiation as a tool. Here we analyzed the production of systemic and intestinal immunity, with protection studies, in several strains of inbred mice, by oral or parenteral route, using 255 Gy irradiated tachyzoites of *T. gondii* RH strain, with challenge with cysts of ME-49 strain. C57Bl/6j, BALB/c and C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ mice were immunized with 10^7 irradiated tachyzoites, by parenteral or oral route. Those preparations, both by parenteral or oral routes, induced the production of specific IgG, mainly of the IgG2b subclass, and IgA immunoglobulins in serum, as determined by ELISA. IgM production was negligible. Parenteral immunized mice showed higher IgG avidity maturation, as compared to oral immunized mice. Fecal excretion of IgG, IgA and IgM was detected in stools of immunized animals, more intense in oral immunized mice. In cellular immunity studies, induced by antigen, with detection of cytokine production by quantitative real-time PCR, there was a great production of IFN- γ by spleen cells, with lower levels in Peyer patches cells, where there was a greater IL-2 production. Challenge studies in immunized mice demonstrated protection to infection in all used schedules, greater in BALB/c mice. C57Bl/6j IFN- $\gamma^{-/-}$ mice, when immunized, showed no signs of disease and produced similar or greater levels of antibodies than wild type mice. They also excreted S-IgA and S-IgM in stools, but with low numbers of brain cysts in parenteral immunized mice, despite similar mortality. Our data points to a fair possibility of use of those irradiated parasites as an oral vaccine, devised to use for veterinary or wild felines vaccination, reducing the production of oocysts by those hosts and interrupting the chain transmission of human toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, ionizing radiation, mucosal immunity, vaccine

RESUMO

***Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Imunidade humoral e celular em baço e intestino de camundongos isogênicos imunizados com taquizoítos irradiados por Cobalto 60**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Estudamos o desenvolvimento de uma vacina para toxoplasmose utilizando a radiação ionizante como ferramenta. Aqui avaliamos o desenvolvimento da imunidade sistêmica e intestinal e a resistência à infecção, em diferentes camundongos imunizados, por via oral e parenteral, com taquizoítos irradiados a 255 Gy e desafiados com cistos da cepa ME49. Camundongos C57Bl/6j, BALB/c e C57Bl/6j IFN- γ ^{-/-} foram imunizados com 10⁷ taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy por diferentes vias. As preparações de taquizoítos irradiados, por via oral e parenteral, induziram produção de imunoglobulinas IgG e IgA no soro de camundongos, sendo predominante a subclasse de IgG2b, determinadas por ELISA. A produção de IgM foi mínima. Os animais imunizados pela via parenteral, apresentaram uma maturação mais rápida da avidéz de anticorpos IgG que os animais imunizados por via oral. Houve excreção de IgG, IgA e IgM nas fezes dos animais imunizados, mais intensa nos animais imunizados por via oral. No estudo da imunidade celular induzida por antígeno e detectada por *real-time* PCR, houve uma grande produção de IFN- γ por células esplênicas, menor por células das placas de Peyer intestinais, onde houve maior produção de IL-2. Houve proteção em todos os nossos esquemas avaliados, maior nos animais BALB/c. Os animais deficientes de IFN- γ , não foram afetados pelo processo de imunização e apresentaram produção de IgG e IgA sérico e excreção de S-IgA e S-IgM nas fezes, com menor número de cistos cerebrais em animais imunizados por via parenteral. Todos nossos dados apontam para a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina oral para toxoplasmose, utilizando taquizoítos irradiados, com aplicação prática na imunização de felinos domésticos e selvagens.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, radiação ionizante, imunidade de mucosa, vacina