INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

***Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Estudo da
imunidade intestinal em camundongos C57Bl/6j
experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

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

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

São Paulo

2004

***“ Nunca abra mão de seus sonhos,
pois se eles morrerem, a vida se torna
igual a um pássaro de asa quebrada:
não consegue voar ”***

Langston Hughes

*Aos meus pais, **Andrés e Ivani**, por permitirem
que eu pudesse chegar até aqui, acima de tudo,
pelo amor, carinho, atenção e dedicação incansável*

*A minha namorada **Janaína**, pelo seu amor,
compreensão, paciência e também por estar
sempre ao meu lado em todos os momentos*

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

*Ao meu irmão **Rodrigo** pelo apoio, incentivo
e por estar sempre ao meu lado*

É para vocês em especial que dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.**, obrigado pela orientação, confiança e pelos ensinamentos transmitidos nesses anos de convivência, principalmente por acreditar no meu potencial e permitir meu ingresso na pesquisa.

Ao **Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto**, pelo companheirismo, parceria profissional e principalmente por me transmitir parte de seu conhecimento desde minha iniciação científica.

Ao “amigão” **Dr. Bruno Andrade Cardi**, pelas inúmeras sugestões dadas durante minha iniciação científica e principalmente pela valiosa amizade conquistada.

À **Dr^a. Nanci do Nascimento**, pela amizade e por me receber de portas abertas no Laboratório de Biologia Molecular/IPEN.

A amiga **Dr^a. Norma de Paula Cavaleiro**, por permitir meu ingresso na carreira científica

Ao amigo **Daniel Perez Vieira**, o “*velhinho*”, pela amizade e companhia nas aulas da pós-graduação e por compartilhar alguns momentos ruins no início difícil deste projeto.

Ao **Dr. André Gustavo Tempone Cardoso**, pela amizade, incentivo e pelas dicas importantes dadas ao longo dos anos.

À **Luciana Regina Meireles**, “*companheira de algumas batalhas*”, obrigado pela confiança e pela oportunidade de trabalhar em conjunto em alguns projetos.

À **Roselaine Pereira Alvim Cardoso**, pelos ensinamentos transmitidos desde a iniciação científica e principalmente por poder contar sempre com sua ajuda.

A **Cláudia Villano**, pela ajuda e paciência demonstrada nas coletas dos materiais utilizados nas análises.

Ao **Henrique César K. Terentowicz**, pelos auxílios em momentos de correria durante o projeto.

Aos meus amigos do laboratório de protozoologia: **Franco Bonetti**, **Vinícius Tsutsui**, **Fernanda Scalzaretto**, **Samanta Borborema**, **Miriam Macre**, **Margoth Garnica**, **Byanca Paiva**, pelos momentos de descontração e pelas “*gargalhadas nossas de cada dia*”.

À Dona **Francisca Lucio de Oliveira**, pelos “*puxões de orelha*” e por sempre oferecer as melhores condições de trabalho no laboratório.

Ao **Luciano Monteiro da Silva**, o “*vampeta*”, pela disposição e pelas assistências indispensáveis durante todas as etapas do projeto.

À **Solange Fernandes Ferreira dos Santos**, pela amizade e por sempre ajudar na parte burocrática dos processos.

À **Dr^a. Eufrozina S. Umezawa**, pelos empréstimos de aparelhos utilizados neste projeto.

A **Marilda S. Nascimento**, pelas inúmeras dicas e sugestões dadas sobre cultura celular.

A **Dr^a. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias** pelas sugestões apresentadas durante o Seminário de Área.

A **Janaína Baptista Alves**, pela colaboração nos ensaios de subclasses e pelo companheirismo e paciência durante as etapas mais difíceis.

Ao amigo **Dr. Patrick Jack Spencer**, pelas inúmeras sugestões e pelas incansáveis gargalhadas nas horas vagas.

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

A todos amigos que fiz no IPEN, em especial, **Murilo Casare, José Alberto, Lucélia Campos** e **Leonardo Mussi**.

A **CAPES** pelo apoio financeiro

Ao **LIM49FMUSP** e a **Supervisão de Radiobiologia/IPEN** pelo suporte ao projeto.

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

À Deus

SUMÁRIO

	Página
I – INTRODUÇÃO	1
1.1 Radiação ionizante	1
1.2 Toxoplasmose	3
1.2.1 <i>Ciclo de vida</i>	3
1.2.2 <i>Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes</i>	6
1.2.3 <i>Toxoplasmose congênita</i>	7
1.2.4 <i>Toxoplasmose em indivíduos imunodeprimidos</i>	8
1.2.5 <i>Toxoplasmose em animais</i>	9
1.3 Vacinas para toxoplasmose	9
1.4 Imunidade intestinal	11
II – OBJETIVOS	16
III- MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Parasitas	17
3.2 Animais experimentais	17
3.3 Irradiação dos parasitas	18
3.4 Imunização dos animais	19
3.5 Obtenção de antígeno salino de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
3.6 Obtenção da suspensão fecal	19
3.7 Obtenção do soro dos animais imunizados	20
3.8 ELISA para detecção de anticorpos IgG e IgA no soro e suspensões fecais	20
3.9 Determinação das subclasses de imunoglobulina G	21
3.10 <i>In vitro induced antibody production</i> (IVIAP) das células esplênicas e intestinais	21
3.11 Proliferação das células esplênicas e intestinais	22
3.12 Desafio dos camundongos	23
3.13 Histopatologia dos cérebros dos animais imunizados	23
3.14 Análise estatística	24

IV – RESULTADOS	25
4.1 Avaliação da resposta imune humoral específica (IgG e IgA) em animais imunizados por via oral em diferentes adjuvantes	25
4.2 ELISA de subclasse de imunoglobulina G	26
4.3 Detecção dos níveis de imunoglobulinas IgG e IgA nas fezes dos animais imunizados	27
4.4 Produção <i>in vitro</i> de anticorpos IgA e IgG em animais imunizados via oral com taquizoítos irradiados (IVIAP)	29
4.5 Respostas proliferativas das células esplênicas e intestinais de camundongos C57Bl/6j imunizados com <i>T. gondii</i> irradiado	31
4.6 Desafio dos animais imunizados contra a cepa cistogênica ME-49 de <i>T. gondii</i>	33
4.7 Análise histopatológica dos cérebros dos animais desafiados	34
V – DISCUSSÃO	36
VI – CONCLUSÕES	43
VII – BIBLIOGRAFIA	44

ANEXOS

Anexo I: Certificado de aprovação da comissão de ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Anexo II: Artigo - MEIRELES, L.R., **GALISTEO JR., A.J.** & ANDRADE JR., H. F. (2003). Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, **40**: 267-271.

Anexo III: Artigo – HIRAMOTO, R.M., **GALISTEO Jr., A.J.**, NASCIMENTO, N. & ANDRADE Jr., H.F. (2002). 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.

Anexo IV: Artigo - HIRAMOTO, R. M., **GALISTEO JR., A. J.**, do NASCIMENTO., N. & ANDRADE JR., H.F. (2002). Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados com 255Gy induzem diminuição de cistos e lesões cerebrais, em camundongos desafiados com cistos da cepa ME-49. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**, **4 (3)**: 715-719.

Anexo V: XIX Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (2003)

Anexo VI: XIX Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (2003)

Anexo VII: XIX Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (2003)

Anexo VIII: XIX Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (2003)

Anexo IX: XIX Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (2003)

RESUMO

***Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Estudo da imunidade intestinal em camundongos C57Bl/6j experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Em nosso estudo pretendemos estudar a via oral para o desenvolvimento de vacina para toxoplasmose utilizando parasitas irradiados por Cobalto-60, como uma alternativa para a prevenção desta importante parasitose. Para tanto, avaliamos o desenvolvimento da imunidade sistêmica e intestinal e a resistência à infecção, em camundongos imunizados por esta via com taquizoítos irradiados a 255Gy, e desafiados com cistos da cepa ME-49. Camundongos isogênicos C57Bl/6j foram imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy em diferentes esquemas e utilizando adjuvantes leite (anti-péptico) e hidróxido de alumínio (anti-ácido). As preparações de taquizoítos irradiados por via oral induziram produção de imunoglobulinas IgG e IgA no soro de camundongos, sendo predominante a subclasse de IgG2a, similar a infecção crônica, determinadas por ELISA. Seu uso com adjuvantes anti-pépticos ou anti-ácidos induziu produção de IgA fecal e menos significativamente de IgG fecal. Existem indícios de indução de tolerância em nível intestinal, com queda da produção de anticorpos e da proliferação celular antígeno dirigida, especialmente quando o leite foi utilizado como adjuvante, em ensaios de produção *in vitro* de anticorpos ou proliferação estimulada por antígenos de *T.gondii*, por esplenócitos e linfócitos intestinais. As preparações orais induziram proteção quantitativa ao desafio dos animais imunizados por cepa cistogênica, que foi semelhante a imunização parenteral, quando o hidróxido de alumínio foi usado como adjuvante.

Todos estes dados mostram a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina oral para toxoplasmose utilizando taquizoítos irradiados, com aplicação prática num futuro próximo para uso em campo, utilizando iscas atrativas para imunizar felinos domésticos e selvagens.

ABSTRACT

***Toxoplasma gondii* vs ionizing radiation: Intestinal immunity induced in C57Bl/6j mice by irradiated tachyzoites.**

Andrés Jimenez Galisteo Jr.

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. There are suggestion of tolerance induction at mucosal level, with lower antigen induced proliferation and lower *in vitro* antibody production by spleen and gut lymphocytes, with the latter doses, specially when milk was used as adjuvant. 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.

I – INTRODUÇÃO

1.1 Radiação ionizante

A radiação ionizante, muito empregada na esterilização de alimentos e produtos hospitalares, também pode ser utilizada na produção de vacinas (Wales & Kusel, 1992), pelo fato de produzir danos diretos ou indiretos sobre as moléculas reprodutoras dos seres vivos.

O potencial 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 o raio ultravioleta tem sido convincentemente úteis na atenuação ou esterilização de agentes biológicos dos mais variados tipos. Em todos os modelos, 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 decorre da transferência da energia para a molécula alvo, provocando ionização e alteração 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.

Os ácidos nucleicos (DNA) e as proteínas são as principais moléculas afetadas, no entanto as proteínas, sua atividade enzimática e lipídeos da membrana celular somente podem ser alterados em doses mais elevadas de radiação (Butler *et al.*, 1984). A radiosensibilidade depende da linhagem celular, e de sua capacidade de reparo dos danos no DNA, que, quando irreversíveis, podem levar a morte celular. A morte celular pode ser imediata, 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 é 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.

Usualmente, a radiação é usada em altas doses apenas para esterilização de alimentos contaminados (Ross *et al.*, 2003), porém vem também empregada no combate a diversas doenças parasitárias. Em protozoários, a radiação afetou *Eimeria tenella* (Protozoa;Coccidia) com 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), mas quando animais imunizados foram desafiados, não houve proteção contra formas sangüíneas virulentas não irradiadas (Salata *et al.*, 1973). Em malária, 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). Vacinas com parasitas irradiados já foram utilizadas com bons resultados tanto para helmintos (Wales & Kusel, 1992) como para *T. gondii* (Hiramoto *et al.*, 2002).

Em *T. gondii*, a radiação foi empregada inicialmente com o objetivo de eliminar a infectividade de cistos em carne contaminadas (Dubey *et al.*, 1986), ou formas infectantes como oocistos (Dubey *et al.*, 1998a; 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 aos 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).

1.2 Toxoplasmose

1.2.1 Ciclo de vida

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa. Os protozoários deste filo apresentam como característica uma estrutura chamada Complexo Apical, responsável pela invasão nas células dos hospedeiros (Dubey *et al.*, 1998b). Este parasita foi descoberto por Nicolle e Manceaux em 1908 em roedores (*Stenodactylus gundi*), e ao mesmo tempo por Splendore em coelho no Brasil.

O *T. gondii* apresenta um ciclo complexo (Figura 1), sendo os felinos os hospedeiros definitivos e o homem e os demais animais de sangue quente considerados hospedeiros intermediários (Dubey *et al.*, 1998b). 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). Após sua ingestão 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 de proliferação rápida, disseminado pela circulação aos outros tecidos onde invadem as células nucleadas, com proliferação e reativação (Dubey *et al.*, 1998b).

Outras formas menos freqüentes da aquisição da doença são através de transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais e transfusão de sangue de indivíduos na fase aguda da infecção (Amato Neto *et al.*, 1995), como pode ser observada no ciclo abaixo.

Figura 1 - Ciclo do *T.gondii*, com suas várias formas de infecção para o homem.

Os taquizoítos (Figura 2), apresentam diversas estruturas comuns as demais células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi e também apresentam organelas características do filo, como os anéis polares, conóide, roptrias e micronemas. 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 endodiogénias (Dubey *et al.*, 1998b).

As principais estruturas envolvidas na penetração são a superfície do agente e o complexo apical. Ao aderir na célula, através de receptores de superfície (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 (Huynh *et al.*, 2003). 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).

Figura 2 – Morfologia esquemática do taquizoíta de *T.gondii*.

Alguns taquizoítos, após a invasão da célula hospedeira desenvolvem-se mais lentamente formando os bradizoítos, que vão formar cistos (Figura 3) principalmente no cérebro, músculo esquelético e cardíaco (Dubey *et al.*, 1998b). 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., 1994). 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 (Dubey, 1993). Estes cistos ao serem ingeridos promovem uma nova infecção em uma via alternativa do ciclo, através da ingestão de carne crua e mal cozida, contendo esses 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 e no caso dos hospedeiros definitivos ocorre a formação de oocistos que são excretados nas fezes contaminando assim o ambiente e outros animais (Dubey, 1993).

Figura 3 – Cistos de *T.gondii* (ME49), em tecido cerebral de camundongo (→). A barra representa 50µm. HE.

1.2.2 Toxoplasmose em indivíduos Imunocompetentes

A toxoplasmose é uma infecção muito prevalente em inúmeras regiões no mundo com importância médica e veterinária. Apesar de infectar com frequência o homem, geralmente causa perturbações leves e temporárias (Remington *et al.*, 1995). Em indivíduos imunocompetentes, a doença é geralmente benigna, podendo causar em alguns casos doença ocular (Roberts & McLeod, 1999). 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,

estudo recente realizado na cidade de Erechin, 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). Na cidade de Jaguapitã, no estado do Paraná, 82,9% dos indivíduos examinados apresentaram 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 (Campos de Goytacazes), a prevalência de toxoplasmose ocular na área rural foi de 14% e na área urbana 8% (Petersen *et al.*, 2001).

1.2.3 Toxoplasmose Congênita

Um importante grupo afetado pela toxoplasmose são gestantes que nunca tiveram contato com o parasita e adquiriram a infecção, podendo através da transmissão transplacentária, ocasionar graves lesões no 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 podendo chegar a cegueira, além de epilepsia ou deficiência mental leve (Remington *et al.*, 1995).

Nos EUA, ocorrem 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 nascimento ocorram 3-4 casos de transmissão congênita da toxoplasmose (Smyth, 1994). No estado do Rio grande do Sul, foram analisadas 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 detectada 5 casos 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 1 a cada 1000 partos (Guimarães *et al.*, 1993).

1.2.4 Toxoplasmose em indivíduos imunodeprimidos

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 de câncer.

Em portadores de 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. (Luft & Remington, 1992). Nestes pacientes, um aspecto importante é a possível reativação da infecção devido aos cistos latentes, causadas 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 a 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 transplantes 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, 4 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).

1.2.5 Toxoplasmose em animais

Recentemente demonstramos que em animais destinados ao consumo humano no Brasil, 9,6% dos suínos (Suaréz-Aranda *et al.*, 2000), 19,25% dos bovinos e 24,5% dos ovinos (Hashemi-Fesharki, 1996), apresentaram positividade para o *T.gondii*. 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). Outra fonte importante de contaminação está no 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 fonte 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 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 (Gottstein, 1995). Foram propostos diversos esquemas de imunizações contra o *T.gondii* em animais, utilizando DNA, proteínas recombinantes e cepas mutantes (Araújo, 1994). Para animais existe 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 *et al.*, 1993). Outras cepas que não produzem cistos também foram utilizadas (ts-4) para imunização, protegendo contra o desafio com cepas virulentas em camundongos, no entanto qualquer falha no sistema imune do hospedeiro pode levar a morte do imunizado (Sayles & Johnson, 1996). Uma outra tentativa para imunizações contra *T. gondii* utilizou plasmídeos para ROP2, porém até o momento não se obteve níveis de proteção satisfatórios contra desafio com a cepa RH, não cistogênica (Leyva *et al.*, 2001). A vacinação com DNA (GRA1, GRA7 e ROP2) induziu proteção parcial contra produção de cistos (Vercammen *et al.*, 2000). Camundongos imunizados com plasmídeos (SAG1) induziram proteção parcial em camundongos desafiados com a cepa RH (Nielsen, *et al.*, 1999; Aosai *et al.*, 1999).

Estudos recentes realizados por nós demonstram que imunização intraperitoneal com taquizoítos irradiados de *T.gondii* induzem uma imunidade celular com produção das citocinas (IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ) por células esplênicas, em níveis semelhantes aos encontrados nos animais cronicamente infectado, e quando são desafiados com a cepa cistogênica ME-49 ocorre diminuição na formação de cistos e lesões cerebrais (Hiramoto *et al.*, 2002). Este sistema de imunização tem a vantagem de proteger da presença de cistos teciduais.

As vacinas que promovem a formação de cistos teciduais não são consideradas a melhor estratégia no combate a toxoplasmose, embora seja uma infecção assintomática, pois alguns estudos têm demonstrado que o *T. gondii* pode modificar o comportamento de seus hospedeiros intermediários, aumentando assim a chance destes serem capturados por seus predadores (Berday *et al.*, 1995; Webster, 2001). Essa alteração de comportamento tem

sido demonstrado em ratos e camundongos (Webster *et al.*, 1994) e inclusive em humanos (Flerg *et al.*, 1996; Havlicek *et al.*, 2001).

Vacinas de DNA têm demonstrado resultados promissores em animais experimentais, mas com baixa imunogenicidade em humanos (Bout *et al.*, 2002), além do questionamento quanto a sua segurança no uso em humanos.

A vacina ideal para 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 poderia ser interrompido se 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. Para este fim é fundamental entendermos a imunidade de mucosa na toxoplasmose.

1.4 Imunidade Intestinal

O epitélio intestinal promove 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 (Kasper *et al.*, 2004).

A importância da imunidade na mucosa intestinal na toxoplasmose, via de entrada no hospedeiro, 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. A infecção pelo *T.gondii* provoca um aumento na produção de anticorpos específicos (IgA) contra o parasita no intestino. Ensaios demonstraram que essa imunoglobulina pode inibir a infecção de enterócitos *in vitro* (Mack & McLeod, 1992). Os linfócitos intraepiteliais (IEL) do intestino participam da resposta imune através da liberação de várias citocinas (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).

Entretanto, muitos pesquisadores demonstraram que a administração oral de determinado antígeno é capaz de reduzir a resposta imune a este antígeno, quando doses subseqüentes são administradas subcutaneamente, sendo esse fenômeno chamado de tolerância imunológica (Janeway *et al.*, 2002). O fenômeno da tolerância imunológica é uma propriedade básica natural do sistema imune, que, ao discriminar entre o próprio e o não-próprio, atenua ou extingue a resposta imune ativa a estruturas reconhecidas como inerentes ao organismo. A tolerância imunológica é adquirida durante a maturação do sistema imune, por mecanismos que deletam ou inativam clones de linfócitos antígeno-específicos (Janeway *et al.*, 2002).

A tolerância é um processo imunológico induzido, em que a administração de determinado antígeno solúvel, via mucosas, induz um estado de hiporresponsividade a imunizações subseqüentes com o mesmo antígeno inoculado por qualquer outra via. A indução de tolerância por via oral se inicia com a apresentação do antígeno exógeno ao sistema imune periférico através do trato digestivo. Portanto, é uma forma de tolerância imunológica extra-tímica, induzida por antígenos que atenuam a resposta a proteínas imunogênicas previamente apresentadas à mucosa. Dessa forma, se obtém importante supressão, tanto da resposta humoral quanto daquela mediada por células, após a administração do antígeno por via oral e subseqüente imunização com o mesmo antígeno (Weiner & Rees, 1999).

Embora a presença de linfócitos na mucosa e submucosa do trato gastrointestinal seja conhecida, a idéia de um sistema imunológico especializado próprio das mucosas é relativamente nova. Como a pele, o epitélio mucoso representa uma barreira entre o meio externo e o interno, e por isso, constitui uma importante linha de defesa do organismo. A resposta imunológica a antígenos administrados por via oral é diferente da resposta clássica a antígenos encontrados em outros locais. As duas principais diferenças estão nos altos níveis de produção de IgA pela mucosa e no

favorecimento à tolerância do linfócito T, ao invés de sua ativação (Weiner, 2001).

O isotipo dominante no sistema imunológico de mucosas é a IgA. Um monômero composto de glicoproteínas produzidos por plasmócitos, quando estes são estimulados por linfócitos B e representa 20% das imunoglobulinas, sendo dividida em duas subclasses, IgA1 (90%) e IgA2 (10%) (Rúpolo *et al.*, 1998). É transportada para o lúmen do intestino através das células epiteliais da base das criptas. A IgA poliméricas liga-se na camada de muco que cobre o epitélio do intestino, atuando como uma barreira antigênica específica para os patógenos e toxinas do lúmen do intestino (Monteiro *et al.*, 2003). A IgA não fixa complemento, por isso pode atuar contra microorganismos sem desencadear a cascata do processo inflamatório que danifica as superfícies epiteliais (Rúpolo *et al.*, 1998).

Estudos mais recentes têm sugerido que respostas imunossupressoras tipo T-2 helper (T_H2) são geradas preferencialmente nas Placas de Peyer, onde as células T se dividem em subtipos produtores de IL-5, IL-10 e, possivelmente, TGF- β (Schoenbeck *et al.*, 1989).

São três os mecanismos básicos implicados na tolerância induzida por antígeno: *deleção clonal*, *anergia clonal* e *supressão ativa*. A *deleção clonal*, ou apoptose de células efetoras é o mecanismo pelo quais clones de linfócitos são eliminados, por morte celular, ao entrarem em contato com o antígeno. A *anergia clonal* é um processo em que clones antígeno-específicos são funcionalmente inativados, mas não destruídos. Dentre os vários mecanismos de anergia, destaca-se aquele onde o linfócito deixa de expressar o receptor para o antígeno e aquele onde ocorre um bloqueio em nível do receptor, não permitindo que o antígeno se ligue a este. E o terceiro é a *supressão ativa*, que representa a circunstância em que os clones de linfócitos passam a não mais responder frente a uma estimulação antigênica, devido à secreção *in situ* de linfocinas inibidoras, tais como IL-4, IL-10 e TGF- β , produzidas por outros linfócitos (Smith *et al.*, 2000).

O primeiro fator que determina a forma de tolerância que se desenvolve após a administração oral do antígeno é a quantidade administrada. Baixas doses de antígeno favorecem o mecanismo de supressão ativa, enquanto altas doses parecem favorecer anergia/deleção. Por sua vez, antígenos de baixo peso molecular e hidrossolúveis levariam a anergia/deleção, enquanto antígenos de maior peso molecular e lipossolúveis induziriam supressão ativa (Friedman & Weiner, 1994). Altas doses de antígeno administradas por via oral parecem resultar em apresentação sistêmica do antígeno. Após a passagem do antígeno pelo intestino, este ganha a circulação como proteína intacta ou como fragmento antigênico. O fato de não haver, supressão ativa com altas doses de antígeno por via oral ainda não está bem esclarecido nos diversos modelos experimentais.

O mecanismo de imunossupressão pode ainda variar com as características específicas do modelo estudado. Por exemplo, no modelo experimental de encefalite autoimune em ratos, as células T CD8⁺ estão implicadas na produção de um sinal supressivo (Lider *et al.*, 1989), enquanto no mesmo modelo, mas em camundongos, as células T CD4⁺ são as responsáveis pelo processo de tolerância (Chen *et al.*, 1994). O sinal supressivo produzido por estas células parece ocorrer, através da secreção de citocinas imunossupressoras, incluindo a IL-4, IL-10 e TGF- β (Chen *et al.*, 1994). Estas citocinas são secretadas por um subgrupo de células T, denominadas T_H2. As secreções destas citocinas produzem supressão antígeno-inespecífica de qualquer resposta imune local (Miller *et al.*, 1991). A forma pela qual o antígeno é apresentado no intestino também parece crucial para a geração da supressão ativa. Possivelmente, estas células estimulam preferencialmente respostas tipo T_H2, devido ao microambiente intestinal ou às diferentes propriedades estimuladoras da célula apresentadora de antígeno (Weiner, 2001).

A apresentação do antígeno pelas células do sistema linfóide intestinal induz, preferencialmente, a geração de células reguladoras. Estas células passam a secretar citocinas inibidoras, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, após qualquer reconhecimento subsequente do antígeno. Vários fatores podem

interferir na geração destas células reguladoras. Dentre eles, destacam-se os fatores de co-estimulação, o microambiente no qual a resposta imune é iniciada e a geração preferencial de epítomos ditos imunogênicos ou tolerigênicos.

Imunizações via oral necessitam serem melhor estudadas, pois é 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 induzida por taquizoítos irradiados (Cobalto 60) em camundongos C57Bl/6j, em esquemas de imunizações orais, avaliando sua capacidade de produzir anticorpos em soro e no intestino e a produção de células responsivas da imunidade celular, além de proteção contra desafio oral com cepa cistogênica.

Específicos

A) Avaliar a produção de anticorpos específicos IgA e IgG e suas subclasses em soro após imunização oral com taquizoítos irradiados.

B) Avaliar a excreção fecal de anticorpos específicos IgA e IgG em animais imunizados via oral com taquizoítos irradiados.

C) Avaliar a resposta humoral e a imunidade celular existente no baço e em placas de Peyer de animais imunizados com taquizoítos irradiados.

D) Avaliar a proteção induzida pela imunização oral em desafio pela mesma via com cistos de cepa cistogênica.

III - MATERIAL E MÉTODOS

Todos os sais e demais reagentes utilizados foram de qualidade pré-análise sendo a água utilizada purificada em sistema Milli-Q®, apresentando resistividade de 18,2 MΩ.cm. Reagentes específicos tem sua fonte citada ao longo do texto.

3.1. Parasitas

Os parasitas de *T. gondii* utilizados nos experimentos, são mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Cepa RH: são mantidos por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss (não isogênico), através de lavagem peritoneal com solução salina ou salina tamponada com fosfato (PBS) - NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH7,2 e subsequente inóculo intraperitoneal (i.p.) em novos animais.

Cepa ME-49 (cistogênica): utilizada no desafio dos animais imunizados, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fausto Araújo, UCLA. É mantida através de sucessivas passagens, com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos Swiss ou C57Bl/6j. Cada animal foi inoculado (v.o.), com uma suspensão de 10 cistos/animal, obtida após macerado de cérebro de camundongos previamente infectados, com 3ml de PBS 0,01M pH 7.2 estéril com antibióticos (Penicilina Cristalina 25.000UI/ml e Estreptomicina 10mg/ml). Para quantificação dos cistos, cerca de 25µl da suspensão cerebral foi colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio de luz, sob objetiva de 40X, com determinação do número de cistos por cérebro analisado.

3.2. Animais Experimentais

Camundongos machos isogênicos C57Bl/6J, com peso 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*. A manipulação dos animais 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).

3.3. Irradiação dos parasitas

Os taquizoítos purificados de *T. gondii* cepa RH, previamente retirado de animais infectados, foram mantidos em banho-de-gelo, e então submetidos à irradiação, na dose de 255Gy com blindagem de 90%, pela exposição a raios γ de uma fonte de ^{60}Co (GAMMACELL, Atomic Energy of Canada, Ltd.), de forma homogênea, em presença de oxigênio, a uma taxa de dose de 6,41 kGy/h. O grupo controle permaneceu na parte externa do equipamento durante todo o tempo de irradiação, para avaliação das condições ambientais. Após a irradiação a viabilidade de todas as amostras foi determinada utilizando o corante Azul de Tripiano, sendo utilizado apenas lotes com viabilidade maior de 95%.

Tanto ao grupo irradiado quanto ao grupo controle foi acrescentado um volume de meio de cultura contendo 50% de soro fetal bovino inativado e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific®) e em seguida foram aliquotados numa concentração final de 1×10^8 taquizoítos/ml em tubos plásticos de congelamento aonde foram mantidos à temperatura de -80°C durante 24 horas e transferidos em seguida para o nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram até o momento do uso (Hiramoto *et al.*, 2002). Após descongelamento, a viabilidade dos agentes era medida por Azul de tripiano, sendo utilizadas somente preparações com viabilidade $> 90\%$.

3.4. Imunização dos animais

Os camundongos C57Bl/6j foram divididos em grupos de 5 animais, imunizados com 1, 2 e 3 doses de Tg* (1×10^7 parasitas/animal, irradiados a 255Gy) a cada 15 dias, por via oral utilizando uma sonda gástrica e tendo como veículo leite bovino (anti-péptico) e/ou hidróxido de alumínio (anti-ácido) (v/v), permitindo assim que o maior número de parasitas chegassem preservados até a mucosa intestinal dos camundongos.

Foram também utilizados, como grupo controle infectado, animais desafiados por via oral com taquizoítos não irradiados.

3.5. Obtenção de antígeno salino de *Toxoplasma gondii* (Camargo *et al.*, 1978)

Os parasitas obtidos do exsudato peritonial de animais previamente inoculados, foram submetidos a 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, foi acrescentado solução de NaCl 0,3M para isotonzar a suspensão, e após, foi submetido a centrifugação a 10000g por 30 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno. A proteína total foi determinada pelo método de Bradford, utilizando gama-globulina humana como padrão (Bradford, 1976). As alíquotas foram mantidas à -80°C até o momento do uso, nos ensaios de ELISA e proliferação celular.

3.6. Obtenção da suspensão fecal

As mostras de fezes foram coletadas a cada dois dias, com determinação de peso para todos os grupos. As fezes dos animais foram maceradas e homogeneizadas em 5ml de solução salina estéril. Em seguida foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos para a separação da fase sólida.

O sobrenadante foi então estocado em tubos tipo eppendorf e mantidos a -20°C até o momento do uso (Li *et al.*, 2001).

3.7. Obtenção do soro dos animais imunizados

As amostras de sangue dos animais foram obtidas, semanalmente, por secção da cauda e coletadas em papéis de filtro, com diâmetro de 5mm ($\cong 5\mu\text{l}$) 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. ELISA para detecção de anticorpos IgG e IgA no soro e suspensões fecais

Placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100 μl (10 $\mu\text{g/ml}$) de antígeno salino de *T. gondii*, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1M 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 solução protéica PBS + albumina bovina (BSA) 2% (Sigma®), durante 1 hora em estufa à 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) e anti-IgA (1/10000) de camundongo, conjugado a peroxidase (Sigma®), com incubação por 1 hora à 37°C. Após lavagens, a revelação da reação foi realizada pela adição de OPD (o – phenylenediamine 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCl 4N. A leitura das densidades ópticas (D.O.) foram feitas em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS®) a 492nm (Venkatesan & Walkelin, 1993).

Para a detecção de anticorpos IgA e IgG, na suspensão fecal, os sobrenadantes foram submetidos os mesmos procedimentos realizados na detecção de anticorpos IgG e IgA nos soros dos animais.

3.9. Determinação das subclasses de imunoglobulina G

Para a análise dos soros dos animais imunizados, foi realizado ELISA como descrito anteriormente, para a determinação das subclasses foram utilizados 100µl por poço de conjugado anti-IgG1, anti-IgG2a e anti-IgG2b de camundongo, conjugado a peroxidase (Southern Biotechnology Associates[®]), diluído 1/2000 em PBS, e incubado por 1 hora à 37°C. Após seis lavagens, a reação foi revelada pela adição de OPD (o – phenylenediamine 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0) e interrompida após 30 minutos pela adição de ácido cítrico 0,2M. A leitura das densidades ópticas foi feita em leitor automático de microplacas a 450nm (Dynatech MR4000) (Venkatesan & Walkelin, 1993).

3.10. *In vitro induced antibody production (IVIAP)* das células esplênicas e intestinais (Caterino-de-Araujo, 1992)

As placas de cultura 96 poços (Corning[®]), foram sensibilizadas com 100µl de antígeno de *T. gondii* (10µg/ml) em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5 (esterilizado em filtro de 0,22µm – Millipore), durante 18 horas à 4°C. Em seguida foram lavadas com PBS e bloqueadas com Albumina Bovina (BSA) 2% (Sigma[®]) por 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37°C, sendo novamente lavadas com PBS. As células esplênicas e intestinais foram obtidas dos camundongos. 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[®]) com 10% soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomicina, 0,25 µg/ml Anfotericina B e 50 µM β-

mercatoethano. Caso houvesse contaminação significativa de hemácias em suspensão foi utilizado uma solução de cloreto de amônio (v/v), então centrifugados a 1500rpm por 15 minutos a 20°C, o sobrenadante foi desprezado e as células resuspensas em 1ml de meio de cultura. As células intestinais e os esplenócitos foram contados em câmara de Neubauer e ajustadas para concentração de 2×10^6 células/ml, em RPMI 1640 com 10% de SFB e antibióticos. As células foram então distribuídas em placas de culturas sensibilizadas numa concentração de 2×10^5 células/poço e foram mantidas em estufa 5% de CO₂ à 37°C por 48 horas, para a adsorção dos anticorpos produzidos. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS e acrescentado conjugado anti-IgG e anti-IgA de camundongo, conjugado a peroxidase (Sigma®), diluído 1/20000 e 1/10000 em PBS, respectivamente, e novamente incubado por 1 hora à 37°C. Após cinco lavagens, a revelação da reação foi realizada pela adição de OPD (o – fenilenodiana 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCl 4N. A leitura das densidades ópticas (D.O.) foram feitas em leitor automático de microplacas a 492nm (Labsystems Multiskan MS®).

3.11. Proliferação das células esplênicas e Intestinais (Candolfi *et al.*, 1994)

Para obtenção das células esplênicas e intestinais, foram utilizados camundongos C57Bl/6j imunizados com 1, 2 e 3 doses de taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy, (após 15 dias da última imunização) e animais cronicamente infectados via oral com 10 cistos da cepa ME-49. As células foram retiradas de maneira estéril em fluxo laminar, contadas e colocadas em placas de cultura de 96 poços na concentração de 2×10^5 células por poço, como descrito no item anterior. As células foram estimuladas com extratos de taquizoítos (5µg/ml) e mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas. Após esse período adicionou-se timidina triciada (Amershan Pharmacia Biotech®) (1mCi/poço em 20µl de meio). Após 18 horas de incubação as

células então foram colhidas em aparelho Cell Harvester (Skatron[®]), utilizando papel FilterMAT 11731 (Skatron[®]). As amostras coletadas foram colocadas em tubos próprios contendo 3ml de líquido de cintilação (PPO 2,5 Difeniloxazol 0,5% + POPOP (1,4-Bis[2-(5fenil)Oxazolil]Benzeno 0,01% em Tolueno). A radioatividade incorporada foi determinada em Cintilador (Wallac[®]) e a contagem apresentada em c.p.m. (cintilações por minuto).

3.12. Desafio dos camundongos

Para a obtenção dos cistos de *T. gondii*, foram utilizados camundongos C57Bl/6j cronicamente infectados com cepa ME-49. 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.). Um grupo controle com camundongos C57Bl/6j normais foram inoculados com as mesmas quantidades de cistos. Após um período de 30 dias, os camundongos foram sacrificados e o cérebro macerado em solução fisiológica e observado em microscopia óptica para a determinação do número de cistos. A mortalidade dos animais foi acompanhada diariamente.

3.13. Histopatologia dos cérebros dos animais imunizados

Após 30 dias os cérebros dos animais, imunizados e desafiados, foram retirados e lavados em solução fisiológica e fixados em formaldeído a 10% tamponado com tampão de Sorensen pH 7,2. Em seguida o material foi incluído em parafina para a confecção dos cortes histológicos, e corados por hematoxilina-eosina (H.E.).

3.14. Análise estatística.

Dados quantitativos de comparação entre grupos de animais imunizados com diferentes esquemas foram analisados por ANOVA (Análise de variância), utilizando o teste posterior de Bonferroni, para identificação da diferença entre grupos, sempre utilizando como nível de significância a probabilidade de igualdade menor que 0.05 ($p < 0.05$).

IV - RESULTADOS

4.1. Avaliação da resposta imune humoral específica (IgG e IgA) em animais imunizados por via oral em diferentes adjuvantes

Grupos de 5 animais C57Bl/6j foram imunizados com 10^7 taquizoítos irradiados por via i.p. (sem adjuvantes) ou por via oral em suspensão isotônica de hidróxido de alumínio, leite ou ambos, em diferentes dose, com intervalos quinzenais. O sangue caudal foi utilizado para a determinação de IgG e IgA por ELISA como descrito em métodos.

Os dados do ELISA para IgG sérico podem ser vistos na Figura 4. Nota-se que todos os esquemas induziram a produção de IgG sérica a partir de 7 dias da primeira dose, nas doses orais subseqüentes não resultaram em incremento dos títulos encontrados, exceto no caso do uso do leite como adjuvante, onde uma ascensão pode ser observada após a terceira dose. A produção de anticorpos foi em menor magnitude que a vacinação i.p ou a infecção crônica pela cepa ME-49.

Figura 4 – Produção de anticorpos IgG específicos no soro de camundongos C57Bl/6j inoculados com 1, 2 e 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255Gy (v.o.), com hidróxido de alumínio (Tg*+H.Al), leite bovino (Tg*+Leite) e a

associação dos dois veículos (Tg*+H.Al.+Leite), detectada por ELISA. As setas indicam os inóculos e a área cinza a negatividade do teste.

A produção de IgA, determinada nas mesmas amostras, pode ser vista na Figura 5, onde é evidente a menor produção sérica desta classe de imunoglobulinas, inclusive sendo apenas evidente na via parenteral após a segunda dose. Interessante notar que a maioria dos adjuvantes orais não mostrou eficiência na produção desta classe de imunoglobulina, exceto o hidróxido de alumínio isolado que gerou níveis séricos significativos e sustentados de IgA. Interessante notar que os níveis séricos de IgA obtidos com a imunização oral são significativamente maiores que os encontrados na fase crônica da infecção.

Figura 5 – Produção de anticorpos IgA específicos no soro de camundongos C57Bl/6j inoculados com 1, 2 e 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255Gy (v.o.), com hidróxido de alumínio (Tg*+H.Al), leite bovino (Tg*+Leite) e a associação dos dois veículos (Tg*+H.Al.+Leite), detectada por ELISA. As setas indicam os inóculos e a área cinza a negatividade do teste.

4.2. ELISA de subclasse de imunoglobulina G

Através do ELISA específico, determinamos a proporção das diferentes subclasses de IgG produzidas em soros dos grupos de 5 animais imunizados com 3 doses de taquizoítos irradiados por via i.p e via oral com diferentes veículos de administração, em comparação com animais infectados cronicamente pela cepa ME-49.

Tanto o grupo imunizado i.p como o grupo ME-49 apresentam os maiores níveis nas três subclasses analisadas, já os grupos vacinados por via oral apresentaram um aumento mais evidente da subclasse IgG2b, semelhante a vacinação i.p e da infecção crônica, embora com menor intensidade. As demais subclasses foram detectadas com as imunizações orais, mas com níveis muito menores.

Figura 6 – Avaliação das subclasses de IgG produzidas em camundongos C57Bl/6j em resposta a vacinação oral com taquizoítos irradiados de *T. gondii*, em diferentes veículos ou i.p. (3 doses). As barras representam os desvios das medidas.

4.3. Detecção dos níveis de imunoglobulinas IgG e IgA nas fezes dos animais imunizados

A avaliação da excreção fecal de IgG e IgA foi feita nos grupos de 5 animais C57Bl/6j, sendo coletadas as fezes em 3 períodos por semana.

A excreção fecal de IgG pode ser vista na Figura 7. Como pode ser observado há uma rápida instalação da excreção fecal de IgG que tende a desaparecer com as doses subseqüentes do imunógeno oral, embora mantida com o imunógeno parenteral. A excreção de IgG seguiu uma relação temporal com as duas primeiras doses, mas esse efeito desapareceu após a terceira dose.

Interessante notar que os níveis obtidos foram semelhantes à infecção crônica para a vacinação i.p e as que receberam leite como adjuvante.

Figura 7 – Produção de anticorpos IgG específicos nas fezes de camundongos C57Bl/6j inoculados com 1, 2 e 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255Gy (v.o.), com hidróxido de alumínio (Tg*+H.Al.), leite bovino (Tg*+Leite) e a associação dos dois veículos (Tg*+H.Al.+Leite), detectada por ELISA. As setas indicam os inóculos e a área cinza a negatividade do teste.

A excreção fecal de IgA, vista na Figura 8, foi mais intensa no grupo imunizado por via parenteral, mas desapareceu e não apresentou incremento

apesar de doses subseqüentes. As imunizações orais produziram excreção mais constante e responsiva à novas doses.

Os níveis finais de IgA encontrados nas fezes com todos os imunógenos foram equivalentes aos encontrados nas fezes de animais cronicamente infectados, apesar dos efêmeros níveis elevados iniciais obtidos nas imunizações.

Figura 8 – Produção de anticorpos IgA específicos nas fezes de camundongos C57Bl/6j inoculados com 1, 2 e 3 doses de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* RH irradiados a 255Gy (v.o.), com hidróxido de alumínio (Tg*+H.Al), leite bovino (Tg*+Leite) e a associação dos dois veículos (Tg*+H.Al.+Leite), detectada por ELISA. As setas indicam os inóculos e a área cinza a negatividade do teste.

4.4. Produção *in vitro* de anticorpos IgA e IgG em animais imunizados via oral com taquizoítos irradiados (IVIAP)

Procedemos à avaliação quantitativa da produção *in vitro* de anticorpos (IVIAP) por células esplênicas e das placas de Peyer dos grupos de 5 camundongos C57Bl/6j imunizados com 3 doses de taquizoítos irradiados por via oral em adjuvante anti-ácido e/ou anti-péptico. Os resultados foram comparados a controles *naïve* e infectados cronicamente.

A produção de IgA *in vitro*, não foi detectada nas células esplênicas dos animais imunizados por via oral, como pode ser visto na Figura 9, mas foi

significativamente elevada por linfócitos intestinais durante as primeiras fases da imunização, decaindo com as doses subseqüentes, sendo mais sustentado no grupo que recebeu anti-ácido como adjuvante.

Figura 9 – Produção de imunoglobulinas IgA *in vitro*, por linfócitos esplênicos (A) e linfócitos intestinais (B) obtidos de camundongos C57Bl/6j, imunizados com 1, 2 e 3 doses v.o. de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy, com hidróxido de alumínio (Tg*+H.A) ou leite bovino (Tg*+Leite) e animais infectados cronicamente com cistos da cepa ME-49. Barras representam SEM.

Na figura 10 observamos a produção de IgG, onde podemos notar que não ocorreu produção desta imunoglobulina por linfócitos esplênicos ou intestinais nos animais imunizados por via oral, diferente da infecção crônica, com aparente supressão após a terceira dose nas células derivadas do intestino.

Figura 10 – Produção de imunoglobulinas IgG *in vitro*, por linfócitos esplênicos (A) e linfócitos intestinais (B) obtidos de camundongos C57Bl/6j, imunizados com 1, 2 e 3 doses v.o. de 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy, com hidróxido de alumínio (Tg*+H.A) ou leite bovino (Tg*+Leite) e animais infectados cronicamente com cistos da cepa ME-49. Barras representam SEM.

4.5. Respostas proliferativas das células esplênicas e intestinais de camundongos C57Bl/6j imunizado com *T. gondii* irradiado

As células esplênicas e as células intestinais obtidas dos camundongos C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados ou infectados cronicamente com a cepa ME-49, foram estimuladas *in vitro* com antígenos de *T. gondii*.

Como podemos observar na Figura 11, os animais imunizados com hidróxido de alumínio mantém resposta proliferativa de linfócitos intestinais

mesmo após 3 doses, comparável a infecção crônica e a imunização parenteral. O uso de leite como adjuvante aumenta a resposta inicial, porém esta resposta é rapidamente suprimida nas doses subseqüentes.

Figura 11 – Resposta proliferativa de linfócitos intestinais em camundongos C57Bl/6j, estimuladas com antígeno de *T. gondii*, e obtidas de camundongos imunizados com 1, 2 e 3 doses de taquizóitos de *T. gondii* irradiados com 255Gy, com hidróxido de alumínio (H.AI), leite bovino (Leite) ou sua associação (Leite+H.AI.) ou cronicamente infectado com cistos da cepa ME-49. As células foram cultivadas por 48 horas, em seguida foi adicionado 1μCi [³H] TdR por 12 horas.

A análise da proliferação celular esplênica nestes animais mostra um padrão progressivo de resposta dose dependente, sendo o leite o melhor adjuvante produzindo resposta maior que a imunização parenteral ou a infecção crônica, como podemos observar na Figura 12.

Figura 12 – Resposta proliferativa de linfócitos esplênicas, estimuladas com antígeno de *T. gondii*, obtidos de animais imunizados com 1, 2 e 3 doses de taquizoítos de *T. gondii* irradiados com 255Gy, com hidróxido de alumínio (H.Al), leite bovino (Leite) ou sua associação (Leite+H.Al.), além de animais cronicamente infectado, com cistos da cepa ME-49. As células foram cultivadas por 48 horas, em seguida foi adicionado 1 μ Ci [3 H] TdR por 12 horas.

4.6. Desafio dos animais imunizados contra a cepa cistogênica ME-49 de *T. gondii*

Para avaliação da eficiência vacinal das preparações orais de taquizoítos irradiados, grupos de 6 camundongos foram imunizados com 1, 2 ou 3 doses de vacina com diferentes adjuvantes, além de grupos controles não imunizados ou com inóculo via parenteral, sendo que, após 2 semanas da última dose vacinal, os animais foram desafiados com 10 cistos da cepa ME-49 por via oral. Após 30 dias, os animais sobreviventes foram sacrificados e determinado a quantidade de cistos cerebrais. O resultado pode ser visto na Figura 13.

No grupo controle houve a morte de 1 animal após 13 dias do desafio e os demais animais se apresentavam extremamente debilitados. A análise do macerado cerebral, por microscopia óptica demonstrou grande quantidade de cistos teciduais. Os grupos imunizados, não apresentaram nenhuma morte e

em nenhum grupo os animais apresentaram sinais clínicos de doença. Todos os animais imunizados apresentaram algum tipo de proteção ao desafio quando comparados ao grupo controle ($P < 0.001$), embora a proteção mais marcante tenha ocorrido no grupo imunizado por via parenteral e naqueles imunizados sem o uso de leite. Nos animais que foram imunizados com veículos utilizando leite isolado ou associado ao hidróxido de alumínio houve apenas proteção parcial quantitativa ($p < 0.05$), ao contrário dos animais imunizados só com hidróxido de alumínio ou no grupo imunizado i.p. ($P < 0.001$), onde a diferença de número de cistos foi intensa com animais com menos de 500 cistos cerebrais.

Figura 13 – Número de cistos cerebrais, identificados por microscopia de contraste de fase, após 30 dias do desafio oral com 10 cistos de ME-49, em camundongos imunizados com diferentes doses e esquemas de imunizações.

4.7. Exame histo-patológico dos cérebros dos animais desafiados

A histopatologia dos cérebros dos animais imunizados com taquizoítos irradiados e desafiados com 10 cistos da cepa ME-49, mostrou o mesmo padrão de proteção encontrado nos estudos quantitativos carga cística cerebral e podem ser vistos na Figura 14.

Figura 14 - Quadro histo-patológico cerebral de camundongos desafiados com a cepa ME-49, sem previa imunização (A e B), imunizados por via parenteral (C e D) e imunizados por via oral utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante (E e F). As setas pretas indicam cistos teciduais e as setas brancas indicam áreas com presença de foco inflamatório (manguito perivascular).

V – DISCUSSÃO

Em geral, nossos dados comprovam não só a eficiência da radiação na produção de imunógenos, mas também a viabilidade do uso oral destas preparações.

A qualidade da preparação de taquizoítos irradiados mostrou dados semelhantes aos anteriormente publicados por nosso grupo (Hiramoto *et al.*, 2002). Apesar de pequenos ajustes necessários, como uma dose de 255Gy e a criopreservação, a viabilidade dos taquizoítos durante o processo de irradiação e preservação não foi afetada significativamente, como demonstrado pela ausência de incorporação do corante de Azul de tripano pelos parasitas, após recuperação das amostras a partir do depósito em nitrogênio líquido. Esse método de diagnóstico rápido de viabilidade de protozoários é muito eficiente e permite o acompanhamento das várias preparações, como já havia sido comprovado anteriormente (Hiramoto *et al.*, 2002), tornando a exequibilidade do uso destas preparações, além de permitir um controle de qualidade individual de cada preparação.

Em nossos ensaios, a imunização via oral utilizando taquizoítos irradiados com 255Gy, não apresentou nenhuma morbidade nos grupos imunizados com hidróxido de alumínio ou leite bovino, diferente do encontrado nos grupos controles desafiados por via oral com taquizoítos não irradiados, onde a mortalidade foi de 100% dos animais, em até 5 dias após a primeira dose. Isto demonstra a esterilidade das amostras, pelo fato de que não havia taquizoítos com reprodução ativa na preparação irradiada, já que a dose letal desta linhagem de *T. gondii* é de apenas um parasita por animal (Grigg & Suzuki, 2003). Nossos dados são semelhantes aos reportados, utilizando imunizações intraperitoniais de taquizoítos irradiados, com ausência de doença e sobrevivência dos camundongos devido à esterilização dos agentes, com perda da capacidade de multiplicação mesmo mantendo seu metabolismo e sua capacidade de invasão celular (Hiramoto *et al.*, 2002).

O nível de IgG específica contra *T. gondii* detectados no soro nos animais imunizados via oral com taquizoítos irradiados à 255Gy, eram

presentes e detectáveis mas inferiores aos níveis dos animais imunizados por via intraperitoneal, demonstrando que antígenos expostos ao trato gastrointestinal são capazes de induzir uma resposta humoral, de menor intensidade que a via parenteral ou a infecção pelo agente, o que já era esperado (Janeway *et al.*, 2002). Esses achados são semelhantes aos encontrados por outros autores, em modelos de imunização intranasal com antígeno recombinante do agente SAG1 associado com toxina colérica, onde foi detectado níveis significantes de IgG sérico após as imunizações (Debard *et al.*, 1996). Esses resultados também foram observados em outros modelos vacinais, quando utilizada administração oral de lipossomos com antígenos de *Escherichia coli*, que induziram uma resposta humoral e mucosal significativa, sendo eficiente na inibição da prevenção de infecção por *E.coli*. (Tana *et al.*, 2003).

Detectamos níveis significativos de IgG nas fezes nos mesmos modelos de imunização oral, apesar desta imunoglobulina apresentar uma queda acentuada após o terceiro inóculo, diferindo dos achados reportados de pequenas quantidades de IgG detectadas após a imunização oral de *T. gondii* sonificado em associação com toxina colérica (Bourguin *et al.*, 1991). Alguns estudos demonstraram que a IgG, juntamente com IgA, produzida no intestino de gatos infectados, atuava na diminuição da penetração dos parasitas de *T. gondii* em fibroblastos, demonstrando assim a importância da presença desta imunoglobulina no trato intestinal na prevenção da infecção (Omata *et al.*, 1997). Uma segunda escolha do hospedeiro para secreção nas fezes, por também se associar ao fragmento secretor, é a IgM (Johansen *et al.*, 2000), mas infelizmente não houve tempo disponível para a padronização do ELISA para esta imunoglobulina em nossos ensaios.

Nossos resultados sugerem que a IgA sérica, pelos maiores e mais estáveis níveis encontrados, principalmente, no grupo imunizado com parasitas irradiados e hidróxido de alumínio (3 doses), esteja envolvida na proteção contra o parasita. A importância dessa imunoglobulina sérica já é descrita com outros parasitas, como em camundongos BALB/c imunizados via oral com proteína recombinante rCWP2 de *Giardia duodenalis*, onde ocorre uma inibição

na liberação de cistos relacionada aos níveis presentes de IgA no soro e nas fezes, diminuindo assim a transmissão da doença (Larocque *et al.*, 2003). Sabe-se que a IgA sérica tem um importante papel em bacteremias por enterobactérias, que ao invadirem a circulação são expostas a IgA sérica, e então, fagocitadas por células de Kupffer no fígado, evitando a septicemia e a doença, sendo assim a IgA uma segunda linha de defesa importante do organismo (Van Egmond *et al.*, 2001).

Por administração de IgA específica do leite, foi possível demonstrar que anticorpos IgA anti-*T. gondii* são de extrema importância na proteção contra a toxoplasmose quando o desafio ocorre de forma natural, por via oral (McLeod e Mack, 1986). Nossos modelos de vacinação induziram a produção de IgA específica nas fezes dos animais imunizados, principalmente após a primeira dose de imunização. Nos demais esquemas, esta produção apresentou uma queda relativa com as demais doses, o que pode sugerir um quadro de indução de tolerância aos antígenos de *T. gondii*. Essa eliminação de células responsivas a antígenos expostos ao trato gastrointestinal varia de acordo com a dose empregada do antígeno, onde altas doses levam a uma deleção ou anergia das células Th1 e Th2 e baixas doses causa a indução de células regulatórias secretoras de IL-4, IL-10 e TGF- β (Weiner, 2001). Interessante notar que apesar destes efeitos, a produção de IgA em mucosa não teve relação com os níveis séricos e pode representar que a excreção fecal desta imunoglobulina sofre tantas variáveis que seria necessário outras abordagens para sua detecção mais precisa, como o uso das alças cegas de Thiry-Vella, onde a sua produção poderia ser medida sem a interferências das bactérias ou dos sucos digestivos que estão em trânsito pelo intestino (Macpherson *et al.*, 2001), com técnica mais sensível.

Os resultados de IVIAP foram promissores, pela eficiência e originalidade na detecção de produção de IgA *in vitro*, tanto por células esplênicas como linfóides intestinais, com resultados muito adequados na detecção de IgA na infecção natural, mas de baixa sensibilidade relativa, necessitando talvez de associação com técnica mais sensível. Uma opção pode ser a determinação das células produtoras utilizando as técnicas de

ELISPOT, descritas na literatura como de maior sensibilidade que a técnica aqui proposta (Nielsen *et al.*, 1999). Por se tratar de tecnologia utilizada originalmente por nós, não encontramos relatos semelhantes na literatura que pudessem auxiliar na interpretação dos resultados. Mesmo a quantificação de produção de células produtoras de anticorpos por ELISPOT de linfócitos de placas de Peyer apresenta raras descrições (Fló *et al.*, 1996), além de sofrer da crítica da difícil determinação do volume real deste órgão, dispostos ao longo do intestino delgado.

A resposta proliferativa das células intestinais, estimuladas por antígenos de *T. gondii*, nos animais imunizados com duas doses foi semelhante aos animais cronicamente infectados com a cepa ME-49, porém o restante dos esquemas de imunizações apresentaram baixos níveis de proliferação. Quando comparamos os níveis de proliferação esplênicas nos mesmos grupos, percebemos que os animais que receberam três doses de taquizóitos irradiados foram os grupos com os maiores índices de proliferação de linfócitos, superiores inclusive dos animais infectados cronicamente. Em modelo de vacina recombinante associando toxina colérica a SAG-1, em camundongos CBA/J, foram encontrados altos níveis de proliferação de linfócitos esplênicos, que foi atribuído ao aumento na expressão de IL-2 e IL-5 (Debard *et al.*, 1996). A queda da proliferação das células intestinais, após a segunda dose, observada em nossos experimentos, pode ter ocorrido, possivelmente devido à indução de tolerância imune pelas seguidas doses orais de antígenos de *T. gondii*, ocasionada por uma supressão dos níveis de IL-2 e IL-5 e a presença de citocinas imuno-supressoras como TGF- β , IL-4 e IL-10, já descritas em modelos semelhantes (Iijima *et al.*, 2001). O esclarecimento destes aspectos necessitam de abordagens complexas como a detecção de linfocinas produzidas pelas células responsivas ao antígeno por ensaios de RT-PCR múltiplos, como já empregado em toxoplasmose (Mennechet *et al.*, 2002). A participação do leite e suas proteínas tem tido este efeito indutor de tolerância em modelos experimentais (Mizumachi & Kurisaki, 2002), o que poderia explicar o efeitos encontrado em nossos modelos.

Os resultados de subclasses de IgG foram interessantes quando comparamos os níveis obtidos pela vacinação parenteral e a infecção natural, mostrando níveis equivalentes de produção de cada subclasse, proporcionando os níveis de proteção obtidos. Este tipo de pesquisa ainda não havia sido feito em toxoplasmose ou em parasitas irradiados e apenas corrobora que o tipo de imunidade produzida por esta formulação é semelhante a infecção natural, como anteriormente descrito e desejado (Hiramoto *et al.*, 2002). Os esquemas de vacinação oral, como já haviam produzido um nível menor de imunoglobulinas séricas, aqui também mostraram uma menor produção, embora presente na maioria das preparações. Cabe notar que a melhor proteção foi obtida com a preparação que apresentou menor níveis de IgG2a, que é o relacionado com a resposta imune celular tipo Th1 (Debard *et al.*, 1996), mais voltado com a eliminação de células infectadas e não a produção de imunoglobulinas voltadas para a prevenção das infecções, como a resposta Th2 encontrada nas preparações onde a proteção foi maior, demonstradas pelas subclasses IgG1 e IgG2b. Obviamente, este tipo de estudo precisa de maior comprovação e talvez direcionamento experimental específico, com citometria de fluxo ou produção de cito ou quimiocinas específicas (Mennechet *et al.*, 2002).

Quando submetemos os animais imunizados aos esquemas de desafio com a cepa ME-49 de *T. gondii*, notamos que todos os grupos apresentaram alguma proteção parcial em relação ao grupo controle. Estudos realizados anteriormente já haviam demonstrado que camundongos imunizados intraperitonal (3 doses) com taquizoítos irradiados apresentavam um alto nível de proteção contra o desafio com a cepa ME-49 (Hiramoto *et al.*, 2002). Entre todos os sistemas de imunizações utilizados por nós, apenas a imunização utilizando *T. gondii* irradiado e hidróxido de alumínio (3 doses), apresentou o mesmo nível de proteção demonstrado pelo inóculo intraperitonal. Imunizações intranasais com SAG1 e toxina colérica também houve proteção parcial contra o desafio de ME-49, porém com níveis inferiores aos encontrados por nós (Debard *et al.*, 1996). A maior eficiência do hidróxido de alumínio como veículo pode ser devido ao seu maior efeito sobre o pH gástrico, protegendo os

taquizoítos irradiados, enquanto que a associação de leite pode ser insuficiente para o bloqueio da ação péptica e a destruição dos taquizoítos, uma outra possibilidade seria a relativa competição entre as proteínas do leite e o antígeno de *T. gondii*. Esta segunda hipótese parece mais provável já que os resultados da associação de adjuvante é semelhante ao uso do leite isolado do que ao hidróxido de alumínio. Outro comentário interessante é que provavelmente a escolha da cepa RH como a fonte de taquizoítos tenha permitido a seleção de uma cepa com maior capacidade invasora e, portanto mais eficiente na invasão celular, o que induziria um maior reposta imune quando comparada às cepas menos virulentas, como a utilizada no desafio, a ME-49, que pela sua menor capacidade de penetração não seria uma boa candidata a este tipo de vacinação oral, perdendo-se seu poder imunogênico frente a destruição pela pepsina e o ambiente gástrico.

Todos estes dados mostram que a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina oral para toxoplasmose tem uma aplicação prática talvez num futuro próximo. 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, numa abordagem ecologicamente correta, sem os riscos de intervenção direta nas populações humanas. Estudos realizados ns 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 presença de um sistema digestivo totalmente compartimentado em ruminantes não favorece a utilização de vacina oral, para esses animais a imunização intranasal apresenta melhores resultados porque permiti que antígenos administrados diretamente na mucosa, sejam identificados rapidamente pelo sistema imunológico, sem ter que passar pelos processos fermentativos da digestão, característicos de animais ruminantes. 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, 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).

Outro fato importante que deve ser analisado é a questão da tolerância oral, causada pela exposição excessiva de antígeno (Weiner & Wu, 2003). Quando pensamos em imunizações por iscas liberadas no meio ambiente, temos que ter o controle do número de iscas ingeridas por esses animais, para que não ocorra a ingestão excessiva de antígenos por um único animal, o que comprometeria a imunização e conseqüentemente os níveis de proteção da população vacinada.

Alguns estudos ainda necessitam serem melhor explorados, mas a contribuição do uso da radiação ionizante na produção de imunógenos, principalmente na produção da vacina para toxoplasmose, pode contribuir muito para reduzir a propagação da doença, inclusive em humanos, inicialmente através da imunização oral dos felinos afetando o ciclo da toxoplasmose.

VI - CONCLUSÕES

Geral

A imunização oral com taquizoítos irradiados, suspensos em adjuvante anti-ácido, produz uma proteção significativa em modelos experimentais de camundongo, induzindo resposta imune e proteção semelhante a vacinação parenteral.

Específicas

A) O uso de taquizoítos irradiados por via oral induz produção de imunoglobulinas IgG e IgA no soro de camundongos, sendo predominante a subclasse de IgG2a

B) O uso de taquizoítos irradiados por via oral com adjuvantes anti-pépticos ou anti-ácidos induz produção de IgA fecal e menor significativamente de IgG fecal, mas a difícil quantificação da produção local impede melhores conclusões.

C) Existem indícios de indução de tolerância em nível intestinal, com queda da produção de anticorpos e da proliferação celular antígeno dirigida, especialmente quando o leite é utilizado como adjuvante.

D) Houve proteção quantitativa ao desafio dos animais imunizados por cepa cistogênica, de maior potencial, quando o hidróxido de alumínio foi usado como adjuvante.

VII – BIBLIOGRAFIA

- AMATO NETO, V., MEDEIROS, E.A.S., LEVI, G.C. & DUARTE, M.I.S. (1995) Toxoplasmose. 4. Edição. SARVIER Editora de Livros Médicos – São Paulo, pp. 29-37.
- AOSAI, F., MUN, H.S., NOROSE, K., CHEN, M., HATA, H., KOBAYASHI, M., KIUCHI, M., STAUSS, H.J. & YANO, A. (1999). Protective immunity induced by vaccination with SAG1 gene-transfected cells against *Toxoplasma gondii*-infection in mice. **Microbiol. Immunol.** **43(1)**: 87-91.
- ARAUJO, F.G. (1994). Immunization against *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Today**, **10(9)**: 358-360.
- BERDOY, M., WEBSTER, J.P. & MACDONALD, D.W. (1995). Parasite-altered behaviour: is effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific?. **Parasitology**, **111(Pt 4)**: 403-409
- BOOTH, K.S.; JAMES, E.R.; POPIEL, I. (1996). Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Cryobiology**, **33(3)**: 330-337.
- BOURGUIN, I., CHARDES, T., MEVELEC, M.N., WOODMAN, J.P. & BOUT D. (1991). Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using cholera toxin. **FEMS Microbiol. Lett.** **65(3)**: 265-271.
- BOUT, D.T., MEVELEC, M.N., VELGE-ROUSSEL, F., DIMIER-POISSON, I. & LEBRUN, M. (2002). Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. **Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.**, **2(3)**: 227-234.

- BRADFORD, M.M. (1976). 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.
- BUTLER, J., LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. (1984). Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. **Radiat. Phys. Chem.** **24(3-4)**: 273-282.
- BUXTON, D. (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora canium* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. **Vet Res.**, **29(3-4)**: 289-310.
- BUXTON, D., THOMSON, K., MALEY, S. WRIGHT, S. & BOS, H.J.(1993). 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.
- 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.
- CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W., MINEO, J.R., TAKIGUTI, C.K. & NAKAHARA, O.S. (1978). Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infect. Immun.**, **21(1)**: 55-58.
- CANDOLFI, E., HUNTER, C.A. & REMINGTON, J.S. (1994). Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. **Infect. Immun.**, **62(5)**: 1995-2001.

- CARDI, B.A., NASCIMENTO, N., ANDRADE Jr, H.F. (1998). 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.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A. (1992). Rapid *in vitro* detection of HIV-1-specific antibody secretion by cells-culture with virus antigens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87(2)**: 239-247.
- CHEN, Y., KUCHROO, V.K., INOBE, J., HAFLER, D.A., WEINER, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science** **265(5176)**: 1237-1240.
- CLARK, J.D. (1996). 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.
- CLUMECK, N., SONNET, J., TAEIEMAN, H., MASCART-LEMONE, F., DE BRUYERE. M., VANDEPERRE, P., DASNOY, J., MARCELIS, L., LAMY, M., JONAS, C. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. **N. Engl. J. Med.**, **310(8)**: 492-497.
- 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.
- DAGHER, R. & LUCAS, K. (1996). Toxoplasmosis in the patients with cancer. **Infect. Med.**, **13**: 998-1000.
- DEBARD, N., BUZONI-GATEL, D. & BOUT, D. (1996). 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.

DUARTE, M.I.S. & ANDRADE JR., H.F. (1994). Toxoplasmose. In: Brasileiro Fo, G., Pitella, J.E.H., Pereira, F.E.L., Bambirra, E.A. & Barbosa, A.I.A. (eds). Bogliolo Patologia, 5ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 1161-1168.

DUBEY, J.P. (1993). Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other cyst-forming coccidian of humans and animals. In: Kreier, J.P. (ed.) Parasitic Protozoa. vol VI, Academic Press, New York, pp. 1-57.

DUBEY, J.P. (1996b). Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Vet. Parasitol.**, **64(1-2)**: 65-70.

DUBEY, J.P. BRAKE, R.J., MURRELL, K.D. & FAYER, R. (1986). Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **Am. J. Vet. Res.**, **47(3)**: 518-522.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. & SPEER, C.A. (1998b). Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, **11 (2)**: 267-299.

DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; THAYER, D.W.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K. (1996a). Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. **J. Parasitol.**, **82(5)**: 724-727.

DUBEY, J.P.; THAYER, D.W.; SPEER, C.A.; SHEN, S.K. (1998a). Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. **Int. J. Parasitol.**, **28(3)**: 369-375.

- FLEGR, J., ZITKOVÁ, S., KODYM, P. & FRYNTA, D. (1996). Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, **113**(Pt 1): 49-54.
- FLÓ, J., ELÍAS, F., BENEDETTI, R. & MASSOUH, E. (1996). Reversible effects on B and T cells of the gut-associated lymphoid tissues in rats malnourished during suckling: Impaired induction of the immune response to intra-peyer patches immunization with cholera toxin. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **80**(2): 147-154.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. & MILLER, N.L.(1970). *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science** **167**(919): 893-896.
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCÓN, J., CASTELLS, D., CORREA, O. & CASARETTO, A. (1999). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Vet. Parasitol.**, **81**(1): 85-88.
- FRIEDMAN, A. & WEINER, H.L. (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **91**(14): 6688-6692.
- GARCIA, J.S., NAVARRO, I.T., OGAWA, L., OLIVEIRA, R.C., GARCIA, S.M.F. & LEITE, J. (1999). 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.

- GILBERT, J.M., FULLER, A.L., SCOTT, T.C. & McDOUGALD, L.R. (1998). Biological effects of gamma-irradiation on laboratory and field isolates of *Eimeria tenella* (Protozoa; Coccidia). **Parasitol. Res.**, **84(6)**: 437-441.
- 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. (1992). An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **Am. J. Ophthalmol.**, **114(2)**: 136-144.
- GOTTSTEIN, B.(1995). *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, **65 (Suppl)**: 89S-95S.
- GRIGG, M.E. & SUZUKI, Y. (2003). Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. **Microbes Infect.**, **5(7)**: 685-690.
- GUIMARÃES, A.C.S., KAWARABAY, M., BORGES, M.M., TOLEZANO, J.E. & ANDRADE JR, H.F.(1993). Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **35(6)**: 479-483.
- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A. (1998). Radiation-induced signal transduction and stress response. **Radiat Res.** **150(Suppl 5)**: S102-108.
- HASHEMI-FESHARKI, R. (1996). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. **Vet. Parasitol.** **61(1-2)**:1-3.
- HAVLICEK, J., GASOVÁ, Z., SMITH, A.P., SVÁRA, K. & FLEGR, J. (2001). Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. **Parasitology**, **122(Pt 5)**: 515-520.

- HIRAMOTO, R.M., GALISTEO JR., A.J., DO NASCIMENTO, N. & ANDRADE JR., H.F. (2002). 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.
- HIRAMOTO, R.M., MAYBAURL-BORGES, M., GALISTEO JR., A.J., MEIRELES, L.R., MACRE, M.S. & ANDRADE JR., H.F. (2001). Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Rev. Saude Publica**. **35(2)**:113-8.
- HSU, H.W., GRADY, G.F., MAGUIRE, J.H., WEIBLEN, B.J. & HOFF, R. (1992). Newborn screening for congenital *Toxoplasma* infection: five years experience in Massachusetts, USA. *Scand. J. Infect. Dis.*, **84(suppl.)**: 59-64.
- HUYNH, M.H., RABENAU, K.E., HARPER, J.M., BEATTY, W.L., SIBLEY, L.D. & CARRUTHERS V.B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion the MIC2-M2AP adhesive protein complex. **EMBO J.**, **22(9)**: 2082-2090.
- IJIMA H., TAKAHASHI, I. & KIYONO, H. (2001). Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. **Rev. Med. Virol.**, **11(2)**: 117-133.
- ISRAELSKI, D.M. & REMINGTON, J.S.(1993). Toxoplasmosis in patients with cancer. **Clin. Infect. Dis.**, **17(suppl 2)**: S423-S435.

- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. (2002). Immunobiology: the immune system in health and disease. 5^a edição. Garland Publishing, New York.
- JOHANSEN, F.E., BRAATHEN, R. & BRANDTZAEG, P. (2000). Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. **Scand. J. Immunol.** **52(3)**: 240-248.
- KASPER, L., COURRET, N., DARCHE, S., LUANGSAY, S., MENNECHET, F., MINNS, L., RACHINEL, N., RONET, C. & BUZONI-GATEL, D. (2004). *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Int. J. Parasitol.**, **34(3)**: 401-409.
- KASPER, L.H. & BUZONI-GATEL, D. (1998). Some opportunistic parasitic infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. **Parasitol. Today**, **14**: 150-156.
- LAROCQUE, R., NAKAGAKI, K., LEE, P., ABDUL-WAHID, A. & FAUBERT, G.M. (2003). Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. **Infect. Immun.**, **71(10)**: 5662-5669.
- LEPAGE, A.C., BUZONI-GATEL, D., BOUT, D.T., KASPER, L.H. (1998). Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** **161(9)**: 4902-4908.
- LEYVA, R., HERION, P., SAAVEDRA, R. (2001). Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.** **87(1)**: 70-9.

- LI, T.; TAKEDA, N.; MIYAMURA, T. (2001). Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. **Vaccine**, **19(26)**: 3476-3484.
- LIDER, O., SANTOS, L.M., LEE, C.S., HIGGINS, P.J. & WEINER, H.L. (1989). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and *in vitro* immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. **J. Immunol.** **142(3)**: 748-752.
- LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S.(1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, **15(2)**: 211-222.
- MACK, D.G. & McLEOD, R. (1992). Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. **J. Clin. Invest.** **90(6)**: 2585-2592.
- MACKOWIAK, M., MAKI, J., MOTES-KREIMEYER, L., HARBIN, T. & VAN KAMPEN, K. (1999). Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology. **Adv. Vet. Med.**, **41**: 571-583.
- MACPHERSON, A.J., HUNZIKER, L., McCOY, K. & LAMARRE, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. **Microbes Infect.**, **3(12)**: 1021-1035.
- MARTINEZ-SILVA, R., LÓPEZ, V.A., COLÓN, J.I. & CHIRIBOGA, J. (1969). *Trypanosoma cruzi*: effects of Gamma Radiation on growth and infectivity. **Experimental Parasitology**, **25(1)**: 162-170.

- MARTINO, R., MAERTENS, J., BRETAGNE, S., ROVIRA, M., DECONINCK, E., ULLMANN, A.J., HELD, T. & CORDONNIER, C. (2000). Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, **31(5)**: 1188-1194.
- MASCHKE, M., DIETRICH, U., PRUMBAUM, M., KASTRUP, O., TUROWSKI, B., SCHAEFER, U.W., DIENER, H.C. (1999). Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, **23(11)**: 1167-1176.
- MATEUS-PINILLA, N.E., DUBEY, J.P., CHOROMANSKI, L. & WEIGEL, R.M. (1999). 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.
- MAYES, J.T., O'CONNOR, B.J., AVERY, R., CASTELLANI, W. & CAREY, W.(1995). Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, **21(3)**: 511-515.
- McCANNEL, C.A., HOLLAND, G.N., HELM, C.J., CORNELL, P.J., WINSTON, J.V. & RIMMER, T.G. (1996). Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. **Am. J. Ophthalmol.**, **121(1)**: 35-46.
- McLEOD, R. & MACK, D.G. (1986). Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** **136(7)**: 2640-2643.
- MENNECHET, F.J., KASPER, L.H., RACHINEL, N., LI, W., VANDEWALLE, A. & BUZONI-GATEL, D. (2002). Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory

- response against an intracellular pathogen. **J. Immunol.**, **168(6)**: 2988-2996.
- MILLER, A., LIDER, O., WEINER, H.L. (1991). Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. **J. Exp. Med.** **174(4)**: 791-798.
- MIZUMACHI, K. & KURISAKI, J. (2002). Induction of oral tolerance in mice by continuous feeding with β -lactoglobulin and milk. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **66(6)**: 1287-1294.
- MONTEIRO, R.C. & VAN DE WINKEL. (2003). IgA Fc receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, **21**: 177-204.
- NETO, E.C., ANETE, E., RUBIM, R., BRITES, A., SCHULTE, J., BECKER, D. & TUUMINEN, T. (2000). High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **Int. J. Epidemiol.**, **29(5)**: 941-947.
- NICOLE, C. & MANCEAUX, L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (organisms voisings) du gondii. **C. R. Hebd. Sceances Acad. Sci.**, **147**: 763-766.
- NIELSEN, H.V., LAUEMOLLER, S.L., CHRISTIANSEN, L., BUUS, S., FOMSGAARD, A. & PETERSEN, E. (1999). Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. **Infect. Immun.**, **67(12)**: 6358-6363.
- NUSSENZWEIG, R.S., VANDERBERG, J.P., MOST, J.P. & ORTON, C. (1969). Specifity of protectives immunity procedures by X-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. **Nature**, **22(192)**: 488-489.

- OKAZAKI, K., (1995). Efeitos da radiação ionizante em células – Noções básicas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. CNEN/SP. São Paulo.
- OMATA, Y., TERADA, K., TAKA, A., ISAMIDA, T., KANDA, M. & SAITO, A. (1997). 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.
- PASSOS, L.N., ARAÚJO-FILHO, O.F. & ANDRADE JUNIOR, H.F. (2000). 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.
- PETERSEN, E., POLLAK, A. & REITER-OWONA, I. (2001). Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.**, **31(2)**: 115-144.
- PINHO, J.R.R., CARDI, B.A., ANDRADE Jr, H.F., BARR, P.J., BATHURST, I.C., VICENTE, E.J. & SCHENBERG, A.C.(1995). 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.
- REMYINGTON, J.S., McLEOD, R. & DESMONTS, G. (1995). Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. & Klein, J.O (EDS). Infectious Diseases of the fetus & newborn infant. 4th edition, W.B. Saunders Company, pp. 140-268.
- ROBERTS, F. & McLEOD, R. (1999). Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. **Parasitol. Today**. **15(2)**:51-57.

- ROBERTS, T. & FRENKEL, J.K. (1990). 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.
- ROBERTS, T., MURRELL, K.D. & MARKS, S. (1994). Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitol. Today**, **10**: 419-423.
- ROSS, A.I.V., GRIFFITHS, M.W., MITTAL, G.S. & DEETH, H.C. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. **Int. J. Food Microbiol.**, **89**: 125-138.
- RUPOLO, B.S.; MIRA, J.G. & KANTOR, Jr.O. (1998). IgA deficiency. **J.Pediatr.(Rio J.)**, **74(6)**: 433-440.
- SABIN, A.B.(1941). Toxoplasmic encephalitis in children. **J. Amer. Med. Ass.**, **116**: 801-807.
- SALATA, E., WIENDL, F.M. & CORRÊA, F.M.A. (1973). Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **15(2)**: 66-71.
- SANTO, A.H., PINHEIRO, C.E. & JORDANI, M.S. (2000). Causas básicas e associadas de morte por Aids, Estado de São Paulo, Brasil, 1998. **Rev. Saúde Pública**, **34**: 581-588.
- SAYLES, P.C., JOHNSON, L.L. (1996). Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** **64(8)**: 3088-3092.
- SCHOENBECK, S., HAMMEM, M.J. & KAGNOFF, M.F. (1989). Vicia villosa agglutinin separates freshly isolated Peyer's Patch T cells into interleukin 5- or interleukin 2-producing subsets. **J. Exp. Med.**; **169(4)**: 1491-146.

- SIBLEY, L.D. (2003). Recent origins among ancient parasites. **Vet Parasitol.**;115 (2): 185-198.
- SMITH, K.M.; EATON, A.D.; FINLAYSON, L.M.; GARSIDE, P. (2000). Oral tolerance. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 162(4): S175 - S178.
- SMYTH, J.D. (1994). Introduction to animal parasitology, 3th edition, Cambridge University Press, pp. 99-104.
- SPLENDORE, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesioni anatomiche d'une malattiache ricorda in moltopunti il Kalazar dell'uomo. Nota preliminaire pel. **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, 3: 109-112.
- SUARÉZ-ARANDA, F., GALISTEO JR., A.J., HIRAMOTO, R.M., CARDOSO, R.P.A., MEIRELES, L.R., MIGUEL, O. & ANDRADE JR., H.F. (2000). The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Vet. Parasitol.** 91(1-2): 23-32.
- SZUMIEL, I. (1994). Ionizing radiation-induced cell death. **Int. J. Radiat. Biol.**, 66(4): 329-341.
- TANA, WATARAI, S., ISOGAI, E. & OGUMA, K. (2003). 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.
- TAYLOR, S.M., MALLON, T.R. & GREEN, W.P. (1986). Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm. **Vet. Rec.**, 119(15): 370-372.

- VAN EGMOND, M., DAMEN, C.A., VAN SPRIEL, A.B., VIDARSSON, G., VAN GARDEREN, E. & VAN DE WINKEL, J.G. (2001). IgA and the IgA Fc receptor. **Trends Immunol.**, **22(4)**: 205-211.
- VAN KNAPEN, F., KREMERS, A.F., FRANCHIMONT, J.H. & NARUCKA, U. (1995). 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
- VENKATESAN, P. & WAKELIN, D. (1993). Elisass for parasitologists: or lies, damned lies and Elisass. **Parasitol. Today**, **9(6)**: 228-232.
- VERCAMMEN, M., SCORZAM, T., HUYGEN, K., DE BRAEKELEER, J., DIET, R., JACOBS, D., SAMAN, E. & VERSCHUEREN, H. (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infect. Immun.**, **68**: 38-45.
- WALES, A. & KUSEL, J.R. (1992). Biochemistry of irradiated Parasite vaccines: suggested models for their mode of action. **Parasitol. Today**, **8(11)**: 358-363.
- WEBSTER, J.P. (2001). Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. **Microbes Infect.**, **3(12)**: 1037-1045.
- WEBSTER, J.P., BRUNTON, C.F.A. & MACDONALD, D.W. (1994). Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, **109 (Pt 1)**: 37-43.
- WEINER, H.L. & VAN REES, E.P. (1999). Mucosal tolerance. **Immunol. Lett.**, **69(1)**: 3-4.

WEINER, H.L. & WU, H.Y. (2003). Oral tolerance. **Immunol. Res.**, **28(3)**: 265-284.

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