UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“VACINA IRRADIADA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM RATAS WISTAR: ANÁLISE MOLECULAR DA CARGA PARASITÁRIA TECIDUAL, TRANSMISSÃO CONGÊNITA E ELIMINAÇAO DO AGENTE PELO LEITE”.

LUCILENE GRANUZZIO CAMOSSI

Botucatu – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

"VACINA IRRADIADA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM RATAS WISTAR: ANÁLISE MOLECULAR DA CARGA PARASITÁRIA TECIDUAL, TRANSMISSÃO CONGÊNITA E ELIMINAÇAO DO AGENTE PELO LEITE".

Lucilene Granuzzio Camossi

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Área Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar como requisito para obtenção do título de doutor.

Botucatu – SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Camossi, Lucilene Granuzzo.
Vacina irradiada de Toxoplasma gondii em ratas Wistar : análise molecular da carga parasitária tecidual, transmissão congênita e eliminação do agente pelo leite / Lucilene Granuzzio Camossi. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Helio Langoni
Capes: 50502034

1. Toxoplasmose em animais. 2. Ratos – Doenças - Vacinação. 3. Vacinação de animais. 4. Toxoplasma gondii. 5. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Carga parasitária; Gestação; Imunização; Ratas; *Toxoplasma gondii*.

Nome do Autor: Lucilene Granuzzio Camossi

Título: VACINA IRRADIADA DE *TOXOPLASMA GONDII* EM RATAS WISTAR: ANÁLISE MOLECULAR DA CARGA PARASITÁRIA TECIDUAL, TRANSMISSÃO CONGÊNITA E ELIMINAÇÃO DO AGENTE PELO LEITE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

_____

Prof. Dr. Italmar Teodorico Navarro
Membro titular
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Faculdade de Medicina Veterinária – UEL – Londrina

_____

Drª Virgínia Bodelão Richini Pereira
Membro titular
Adolfo Lutz – UNESP – Bauru

_____

Profª Drª Simone Baldini Lucheis
Membro titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

_____

Dr. Rodrigo Costa da Silva
Membro titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

_____

Data da Defesa: 17 de maio de 2013.

"O começo de todas as ciências é
o espanto de as coisas serem o que são".

Aristóteles

Dedico minha tese e meus melhores sentimentos
Daniel, meu noivo
Herminia, minha mãe
Lucimara, minha irmã
Que fazem tudo valer à pena

AGRADECIMENTOS

Ofereço meus sinceros agradecimentos àqueles que fazem parte direta ou indiretamente deste estudo ou pelo fato de simplesmente existirem em minha vida. Aos co-autores deste trabalho e da minha vida:

À Deus

"Como não acreditar em Deus se há jardins? Um jardim é a face visível de Deus. E essa face me basta". (Rubem Alves)

Agradeço por me conceder sempre mais do que preciso e mereço. Presença leve e suave no minha vida, que se revela na figura de minha família, nos meus amigos, no meu trabalho, nos animais.

Aos animais

"O que o animal precisa para seu bem-estar é de pessoas com cabeça fria e coração quente, sensíveis ao seu sofrimento, e que busquem meios práticos de aliviá-los". (Charles Hume)

As ratas, que tiveram suas vidas cedidas involuntariamente em função desta pesquisa, expresso o meu respeito, não será em vão.

À Família

Não havíamos marcado hora, não havíamos marcado lugar. E, na infinita possibilidade de lugares, na infinita possibilidade de tempos, nossos tempos e nossos lugares coincidiram". (Rubem Alves)

Ao Daniel F. F. Cardia, meu companheiro de vida e de profissão, desde a graduação sempre juntos, nos bons momentos, e mais juntos ainda nos momentos nem tão bons assim. Exímio helmintologista, daqueles em extinção, que leva a parasitologia no coração. Por mim ele encara a estatística, a imunologia, a tradução cientifica, meu melhor amigo, esse cara é você!

E ainda que conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, sem o amor, nada seria. (Coríntios)

À minha mãe, Herminia G. Camossi, sempre a minha espera com aquele abraço acolhedor, agradeço por permitir que eu pudesse concluir mais esta etapa com tranquilidade, e acima de tudo, pelo amor humanamente divino, pelo carinho e pelas mãos sempre juntinhas pedindo que Deus me abençoe. Ao meu pai Olair Camossi (in memorian), minha gratidão e saudades.

À minha irmã, Lucimara Granuzzio Camossi, por estar sempre ao meu lado, no incentivo, na partilha, pelo exemplo de profissional e de pessoa, que muito me inspira. Agradeço a companhia em todos os meus passos.

Ao minha irmã Fernanda Granuzzio Martins e cunhado Cássio Martins, pelo apoio e torcida, pelos momentos sempre alegres, e ao mais novo integrante da família, meu sobrinho Victor Granuzzio Martins, que trouxe toda a esperança renovada.

Aos professores

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...” (Rubem Alves)

Ao meu orientador, Prof. Helio Langoni, professor por vocação, que carrega nos olhos o brilho do amor pelo ensino, que ensina e encanta seus alunos, que chama cada um pelo seu nome. Agradeço a oportunidade do aprendizado diário, pela orientação incansável nestes sete anos de convivência, da residência ao doutorado.

A Profa. Katia Denise Saraiva Bresciani, que nos acompanha, a mim e ao Daniel, desde a graduação. È daquelas pessoas de alma perfumada e coração aberto, que semeia o bem, que consegue conciliar de forma tão harmônica competência e doçura. Muito obrigada por tudo.

À Profa. Simone Baldini Lucheis, sempre dedicada e paciente, meus agradecimentos por sua permanente solicitude em participar da minha formação desde a residência, pelo cuidado e forma carinhosa nas correções, nos conselhos e na motivação.

Ao Prof. Italmar T. Navarro, por gentilmente aceitar participar da minha banca de doutorado, seu trabalho com a toxoplasmose é inspirador, suas pesquisas alcançam a população muito além do muro da universidade.

Ao Prof. Paulo F. Domingues pelas correções e contribuições em meus exames de qualificação, agradeço a participação nesta caminhada desde a residência e disponibilidade irrestrita sempre que procurado

A Prof. Luciana Regina Meireles por gentilmente aceitar participar desta banca como membro suplente.

Ao CENA-ESALQ e Prof. Julio Walder pelas irradiações necessárias para o desenvolvimento da pesquisa e pela atenciosa acolhida em seu laboratório

Ao Prof. João Luis Garcia por ceder os oocistos necessários ao experimento e pela recepção gentil no laboratório da UEL.

Sou grata e honrada pelos professores que tive na graduação, na Unesp Araçatuba, em especial a Profa. Maria Cecília Rui Luvizotto, Profa. Elisa Helena Giglio Ponsano e Carlos N. Kaneto que serão sempre inesquecíveis a mim.

Aos amigos

***“A amizade multiplica as coisas boas e divide as más"* (Baltasar Gracián)**

Ao querido amigo Felipe Fornazari, pela ajuda fundamental e diária durante o período de coletas dos experimentos, nos procedimentos de anestesia, coleta de sangue, “ordenha” de leite, na ressuscitação das ratas que insistiam em não voltar. Agradeço também aos improvisos e inventos ao estilo “MacGyver”, e as doses de humor ácido que me arrancavam várias risadas.

A querida amiga Virgínia Richini Pereira, exemplo de profissional e pesquisadora, agradeço pelos ensinamentos biomoleculares e desprendimento em compartilhar seus conhecimentos. Meu muito obrigada por poder contar em todos os momentos, foi uma honra trabalhar com você.

Ao amigo querido Rodrigo Costa da Silva pela ajuda direta neste estudo, na análise estatística e valiosa contribuição em várias etapas deste trabalho, pelo exemplo de profissional brilhante e dedicado. Muito obrigada!

Agradeço e homenageio meus amigos queridos, que não participaram diretamente do trabalho, mas que são imprescindíveis em fazer meus dias mais felizes, que tenho o privilégio de conviver e dividir meus dias na faculdade, aos "meninos": Felipe de Freitas Guimarães, Gustavo Puglia Machado, Benedito D. Menozzi, Ebivaldo Gonçalves, Diego Generoso, Ubiraja de Lavor, Guido W. Gomes, e as "meninas": Marcela de Pinho Manzi, Anelise Salina, Carla Coiro, Pâmela Marson, Gabriele Kiko, Marcella Troncarelli, Dani Barbosa, , Laís Paíz, Gabriela Capriogli, Gisele Paz e Raíssa Cavalcanti que sabem que é possível crescer e vencer, um dia de cada vez, sem passar por cima de ninguém.

As minhas amigas de pós-graduação, Patricía Y. Faccioli e Leila S. Ullmann pessoas maravilhosas, agradeço o carinho sempre presente e a preciosa amizade.

Aos inesquecíveis amigos que hoje percorrem seus caminhos fora da Unesp, mas que estão guardados nas minhas melhores lembranças: Haroldo Greca, Ana Paula F. L. Corrêa, Jéssica Soares, Diego Borin Nóbrega, Priscila Barbante, Fábio Shimabokuru, Deolinda Vieira.

Aos funcionários do departamento, Seu Roberto e Adilson (Pardal), agradeço o suporte diário no cuidado das ratas, nas dicas e ensinamentos. A técnica Adriana sempre solícita e disposta a ajudar.

As secretárias da limpeza, Dona Rita e Adriana pelos saudáveis dedinhos de prosa, que muito nos ensinam pelo exemplo de vida e alegria.

A Cidinha e ao Guilherme, pela compreensão em dividir o prof. Helio, que abdica alguns momentos com a família para intermináveis correções de textos.

Ao secretário da Pós-graduação José Roberto Lalla Júnior, competente em tudo que faz, eficiente, correto e sempre pronto a nos ajudar com aquele sorriso no rosto sempre presente.

A FAPESP

A FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo 2010/02141-2) e interesse pelo estudo. Aos relatores ocultos que muito contribuíram durante as sugestões dos pareceres dos relatórios.

LISTA DE QUADRO

QUADRO 1. Desenho experimental dos grupos analisados no estudo I..... 13
QUADRO 2. Desenho experimental dos grupos analisados no estudo II..... 14
QUADRO 3. Etapas da amplificação das regiões codificadoras dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de *T.gondii*..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência relativa (%) de positivos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) convencional para a detecção de *T. gondii* em amostras de tecidos, nos diferentes grupos analisados (experimento I) 35
Tabela 2. Análise estatística, medianas e percentil de 25% e de 75% de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre os diferentes grupos analisados, segundo tecido analisado (experimento I) 36
Tabela 3. Análise estatística, medianas e percentil de 25% e de 75% de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre grupos imunizados e não imunizados do experimento I, independentemente do tecido analisado, com base na forma infectante 40
Tabela 4. Perfil de fecundidade e infecção congênita em ratas dos grupos experimentais, com respectiva mediana de carga parasitária e percentis 25% (P25) e 75% (P75) para *T. gondii* nos neonatos do experimento I, comparando-se grupo imunizado com não imunizado, de acordo com a forma infectante inoculada..... 41
Tabela 5. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgM (RIFI-IgM), nos diferentes grupos analisados (experimento I) 43
Tabela 6. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgA (RIFI-IgA), nos diferentes grupos analisados (experimento I) 44
Tabela 7. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG), nos diferentes grupos analisados (experimento I) 45
Tabela 8. Valores médios de leucócitos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas *e* desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento I) 49

Tabela 9. Valores médios de linfócitos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento I) 50
Tabela 10. Valores médios de neutrófilos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento I) 51
Tabela 11. Valores médios de monócitos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento I) 52
Tabela 12. Comparação entre as médias da contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos e macrófagos presentes no intestino delgado das ratas submetidas a diferentes protocolos de imunização e exposição, no experimento I..... 54
Tabela 13. Frequência relativa (%) de negativos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) convencional para a detecção de *T. gondii* em amostras de tecidos, nos diferentes grupos analisados (experimento II) 58
Tabela 14. Análise estatística medianas e percentil de 25% e de 75% de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre os diferentes grupos analisados, segundo tecido analisado (experimento II) 59
Tabela 15. Análise estatística, medianas e percentil (P25) e de 75% (P75) de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre grupos imunizados e não imunizados do experimento II, independentemente do tecido analisado..... 63
Tabela 16. Perfil de natalidade e infecção congênita em ratas dos grupos experimentais, com respectiva mediana de carga parasitária e percentil 25% (P25) e de 75% (P75) para *T. gondii* nos neonatos do experimento II, comparando-se grupo imunizado com não imunizado, de acordo com a forma infectante inoculada..... 64
Tabela 17. Quantificação da carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* em cinco colheitas de leite (experimento II) 65
Tabela 18. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgM (RIFI-IgM), nos diferentes grupos analisados (experimento II)..... 68
Tabela 19. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para

anticorpos da classe IgA (RIFI-IgA), nos diferentes grupos analisados (experimento II) 69
Tabela 20. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG), nos diferentes grupos analisados, experimento II 70
Tabela 21. Valores médios de leucócitos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento II) 74
Tabela 22. Valores médios de linfócitos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento II) 75
Tabela 23. Valores médios de neutrófilos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento II) 76
Tabela 24. Valores médios de monócitos (células/mL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C) (experimento II) 77
Tabela 25. Comparação entre as médias da contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos e macrófagos presentes no intestino delgado das ratas submetidas a diferentes protocolos de imunização e exposição, no experimento II..... 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alojamentos das ratas em gaiolas de polipropileno..... 15
Figura 2. Colocação de brincos de identificação em ratas do experimento 16
Figura 3. Formas infectantes de *Toxoplasma gondii*: taquizoítos (A), cistos (B), oocistos (C)..... 16
Figuras 4. Camundongos inoculados com cistos de *Toxoplasma gondii* 18
Figura 5. Irradiador Gammabeam 650 (ESALQ/USP) 19
Figura 6. Rata em recipiente saturado com isoflurano (A). Aplicação intraperitoneal dos anestésicos quetamina e xilazina (B). Tricotomia da região do tórax (C)..... 22
Figura 7. Antissepsia da região torácica (A). Punção intra-cardíaca para colheita de sangue (B)..... 21
Figura 8. Massageamento da glândula mamária (A). Colheita de leite com auxílio de ponteira acoplada em pipeta manual 24
Figura 9. Abertura cavidade abdominal (A). Órgãos abdominais expostos (B). Abertura e retirada de cérebro (C). Colheita de fragmento de intestino delgado para histologia (D)..... 25
Figura 10. Intensidade de fluorescência emitida por duas amostras teciduais positivas (setas verdes) pela PCR quantitativa, de acordo com o ciclo de amplificação. Demais amostras referentes à curva-padrão..... 28
Figura 11. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido cerebral, nos oito grupos experimentais (experimento I) 37
Figura 12. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de coração, nos oito grupos experimentais (experimento I)..... 37
Figura 13. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido hepático, nos oito grupos experimentais (experimento I) 37
Figura 14. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro anterior esquerdo (MAE) e membro anterior direito (MAD), nos oito grupos experimentais (experimento I)..... 38
Figura 15. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro posterior esquerdo (MPE) e membro posterior direito (MPD), nos oito grupos experimentais (experimento I)..... 38

Figura 16. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de dorso esquerdo (DE) e dorso direito (DD), nos oito grupos experimentais (experimento I)..... 38
Figura 17. Mediana e variação interquartil, limites mínimo e máximo, e média da carga parasitária entre os tecidos analisados para cada grupo do experimento I 39
Figura 18. Variação entre média e desvio padrão das concentrações de anticorpos IgG, IgM e IgA de acordo com o grupo estudado do experimento I..... 46
Figura 19. Média de cistos teciduais observados nos tecidos das ratas de acordo com o grupo estudado para o experimento I 47
Figura 20. Mediana e variação interquartil, limites mínimo e máximo, e média da contagem de células do sistema imune no intestino delgado dos animais do experimento I, de acordo com os grupos estudados..... 55
Figura 21. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido cerebral, nos oito grupos experimentais (experimento II)..... 60
Figura 22. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de coração, nos oito grupos experimentais (experimento II) 60
Figura 23. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido hepático, nos oito grupos experimentais (experimento II)..... 60
Figura 24. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro anterior esquerdo (MAE) e membro anterior direito (MAD), nos oito grupos experimentais (experimento II)..... 61
Figura 25. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro posterior esquerdo (MPE) e membro posterior direito (MPD), nos oito grupos experimentais (experimento II)..... 61
Figura 26. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de dorso esquerdo (DE) e dorso direito (DD), nos oito grupos experimentais (experimento II)..... 61
Figura 27. Mediana e variação interquartil, limites mínimo e máximo, e média da carga parasitária entre os tecidos analisados para cada grupo do experimento II 62

Figura 28. Mediana e variação interquartil, limites mínimo e máximo, e média da carga parasitária presente no leite das lactantes do experimento II, de acordo com os grupos estudados 66
Figura 29. Variação entre média e desvio padrão das concentrações de anticorpos IgG, IgM e IgA de acordo com o grupo estudado do Experimento II..... 71
Figura 30. Média de cistos teciduais observados nos tecidos das ratas de acordo com o grupo estudado para o experimento II 72
Figura 31. Mediana e variação interquartil, limites mínimo e máximo, e média da contagem de células do sistema imune no intestino delgado dos animais do experimento II, de acordo com os grupos estudados..... 80

LISTA DE ABREVIAÇÔES

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Gy– Gray

IFN-γ– Interferon gamma

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatobility Complex)

mL - mililitros

NK – Natural Killer

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

PMNs – Polimorfonucleares

qPCR– Reação em Cadeia pela Polimerase Quantitativa

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SPF – Specific Pathogen Free

Th – Linfócito T helper

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

μL – microlitros

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

SUMÁRIO

Página

RESUMO iii

ABSTRACT iv

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

3. OBJETIVOS 11

4. MATERIAL E MÉTODOS 12

4.1. Animais de experimentação 12

4.2. Descrição dos experimentos 12

4.3. Período de adaptação e manutenção das ratas 14

4.4. Parasitos 16

4.5. Produção do inóculo vacinal 18

4.6. Irradiação do inóculo 19

4.7.Produção de antígeno e confecção das lâminas para Reação de Imunofluorescência Indireta 20

4.8. Anestesia 20

4.9. Colheitas de sangue 21

4.10. Vacinação 22

4.11. Reprodução 22

4.12. Desafios orais 22

4.13. Parto 23

4.14. Colheita de leite 23

4.15. Colheita de órgãos 24

4.16. Variáveis analisadas 25

4.16.1. Procedimentos biomoleculares 25

4.16.2. Procedimentos sorológicos 28

4.16.3. Contagem de cistos cerebrais 30

4.16.4. Leucograma 30

4.16.5. Histologia 30

4.17. Análise estatística 31

5. RESULTADOS 33

5.1. Experimento I 33

5.1.1. Reação em Cadeia pela Polimerase 33
5.1.2. Sorologia 42
5.1.3. Contagem de Cistos cerebrais 47
5.1.4. Leucograma 47
5.1.5. Histopatologia 53
5.2. Experimento II 56
5.2.1. Reação em Cadeia pela Polimerase 56
5.2.2. Sorologia 66
5.2.3. Contagem de Cistos cerebrais 72
5.2.4. Leucograma 74
5.2.5 Histopatologia 78
6. DISCUSSÃO 81
6.1. Reação em Cadeia pela Polimerase 81
6.2. Sorologia 87
6.3. Contagem de cistos cerebrais 88
6.4. Leucograma 89
6.5. Histologia 92
7. CONCLUSÃO 95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98

CAMOSSI, L.G. **VACINA IRRADIADA DE TOXOPLASMA *GONDII* EM RATAS WISTAR: ANÁLISE MOLECULAR DA CARGA PARASITÁRIA TECIDUAL, TRANSMISSÃO CONGÊNITA E ELIMINAÇAO DO AGENTE PELO LEITE.** Botucatu, 2013. 109p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A toxoplasmose se destaca pela elevada importância médica, veterinária e zootécnica, e seu controle tornou-se um desafio para a saúde pública em todo o mundo, sinalizando a prioridade em buscar na vacinação uma estratégia para conter a infecção. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a proteção conferida pela pré-imunização, com vacina constituída de taquizoítos irradiados a 255 Gy, com raios γ, em ratas Wistar, contra desafios orais por diferentes estágios infectantes do *Toxoplasma gondii*. Nos experimentos foi investigada a proteção vacinal contra formação de cistos cerebrais, cistos na musculatura esquelética, transmissão congênita e eliminação do agente pelo leite. A vacina foi administrada por via oral, com uso de adjuvante, em três doses com intervalos de 15 dias, antes do acasalamento das ratas. Constatada a gestação, realizou-se o desafio oral das ratas com bradizoítos, oocistos e taquizoítos de *T. gondii*. Foram utilizadas ratas Wistar em idade reprodutiva, que foram distribuídas em dois experimentos, composto por oito grupos cada. No experimento I cada grupo foi formado por seis ratas e, no experimento II, por cinco ratas. Os animais em cada experimento foram distribuídos da seguinte forma: Grupo 1: imunizado e desafiado com bradizoítos (ME-49) de *T. gondii*; Grupo 2: desafiado com bradizoítos (ME-49) de *T. gondii*; Grupo 3: imunizado e desafiado com oocistos (ME-49) de *T. gondii*; Grupo 4: desafiado com oocistos (ME-49) de *T. gondii*; Grupo 5: imunizado e desafiado com taquizoítos (RH) de *T. gondii*; Grupo 6: desafiado com taquizoítos (RH) de *T. gondii*; Grupo 7: apenas imunizado, Grupo 8: não imunizado e não desafiado. Semanalmente, desde a imunização, foram realizadas análises sorológicas e hematológicas. Após a parição (experimento I), as ratas e neonatos foram eutanasiados para determinação da carga parasitária no cérebro e na musculatura esquelética, pela PCR em tempo real, e colheita de tecido intestinal, para posterior realização de exames histopatológicos e imunológicos. Durante a lactação (experimento II), o leite foi colhido, para análise molecular do agente, além das demais análises realizadas no experimento I. Os resultados indicam que a imunização com vacina irradiada de taquizoítos de *T. gondii* promoveu redução da carga parasitária na maioria dos órgãos analisados, apesar de não impedir o estabelecimento da infecção com o parasito. No experimento I a imunização mostrou efeito favorável quanto à natalidade e tamanho da ninhada. No experimento II a vacina favoreceu a redução da carga parasitária dos neonatos, porém não influenciou o tamanho da ninhada e taxa de concepção. Quanto à detecção do parasito no leite, não houve diferença entre ratas imunizadas e não imunizadas.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, vacina, DNA, carga parasitária, ratas Wistar.

CAMOSSI, L.G. **IRRADIATED *TOXOPLASMA GONDII* VACCINE IN WISTAR RATS: MOLECULAR ANALYSIS IN TISSUE PARASITE LOAD, CONGENITAL TRANSMISSION AND ELIMINATION OF THE AGENT IN MILK.** Botucatu, 2013. 109p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Toxoplasmosis has high medical and veterinary importance, their control has become a challenge to public health worldwide, signaling the priority in seeking vaccination strategy to contain the infection.The objective of the present study was to evaluate the efficacy of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) tachyzoites irradiated vaccine, administered in experimentally inoculated Wistar female rats by oral challenges against different infectious stage of *Toxoplasma gondii* for blocking the production of *T. gondii* cysts in brain and muscle tissues, congenital transmission and also the elimination of the parasite in milk. Vaccine was administered orally, plus aluminium hidroxy as adjuvant, with three doses of 15 days interval. One week after pregnancy confirmation, challenge was done by gavage with *T. gondii* cysts, oocysts and tachizoites. Wistar rats in reproductive stage were distributed in two studies, composed by eight groups of six animals each (experiment I) an five animals each (experiment II), as follows: Group 1: immunized and challenge with bradizoites of ME-49 *T. gondii* strain; Group 2: non- immunized and challenged bradizoites of ME-49 *T. gondii* strain; Group 3: immunized and challenged with oocysts of ME-49 *T. gondii* strain; Group 4: non- immunized and challenged with oocysts of ME-49 *T. gondii* strain; Group 5: immunized and challenged with tachizoites of RH *T. gondii* strain; Group 6: non- immunized and challenged with tachizoites of RH *T. gondii* strain; Group 7: only immunized, Group 8: non- immunized and non-challenged. Weekly, after vaccination serological and hematological were performed. After parturition (Experiment I), the rats and newborns were euthanized, tissues and organs were collected for parasite load evaluation by Real Time PCR, intestinal tissue was collected for subsequent histological examinations, immunological involved in immune response against *T. gondii*. During lactation (experiment II), the milk was collected for analysis of molecular agent, besides the other analyzes performed in experiment I. The results indicate that immunization with irradiated tachyzoites of *T. gondii* promoted reduction of the parasitic load in most organs analyzed, although not prevent the establishment of infection with the parasite. In experiment I immunization showed a favorable effect on the birth rate and litters' size. In the second experiment the vaccine favored reducing the parasitic load of neonates and did not affect litter size and conception rate. As the parasite detection in milk, there was no difference between immunized and non-immunized rats.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, vaccine, DNA, parasitic load, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença parasitária de elevada importância veterinária, zootécnica e de saúde pública, uma vez que acarreta prejuízos na criação animal, gerado pelas perdas reprodutivas e econômicas, além de sua implicação na saúde humana, já que o consumo de carne e leite de animais infectados podem facilitar a transmissão dessa zoonose (JITTAPALALONG et al., 2005; WEISS e DUBEY, 2009).

Na medicina veterinária o desenvolvimento de vacinas é necessário para controlar a infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii*, prevenir a toxoplasmose congênita, e impedir a eliminação de oocistos pelos felídeos, hospedeiros definitivos (INNES e VERMEULEN, 2006). Em animais de produção a vacina seria uma ferramenta importante para prevenir o aborto, diminuir as perdas econômicas e reduzir ou eliminar a formação de cistos teciduais em animais produtores de carne e leite, reduzindo assim, a via epidemiológica de maior importância para a infecção humana (HAUMONT et al., 2000). Portanto, o desenvolvimento de vacinas para prevenir ou reduzir a formação de cistos teciduais em animais destinados à produção de carne e de leite, pode ser de grande benefício na redução de riscos de transmissão do parasito aos humanos (INNES et al.,2009).

Na medicina humana a formulação de vacinas contra *T. gondii* tem sido alvo de diversos estudos e sua importância é decorrente dos problemas ocasionados em grupos de riscos, tais como mulheres grávidas e pacientes imunocomprometidos (CUPPARI et al., 2008; JONGERT et al., 2008). Apesar dos inúmeros estudos envolvendo a produção de imunógenos, até o momento nenhuma vacina humana apresentou eficácia comprovada (TAIT e HUNTER, 2009).

Para a elaboração de qualquer vacina o ponto de partida é a constatação da possibilidade de induzir imunidade no hospedeiro contra a infecção. Na toxoplasmose esta evidência foi verificada em muitas espécies de hospedeiros, com o desenvolvimento de imunidade protetora contra *T. gondii* após a infecção natural, o que tem levado os pesquisadores a procurarem na vacinação uma estratégia para controlar a doença, a multiplicação e o

estabelecimento do parasito nos animais (INNES et al., 2009), busca esta que continua até os dias atuais.

Na toxoplasmose congênita a possibilidade do uso da vacinação como medida de controle está no fato de que em mães previamente expostas ao *T.gondii*, a infecção para o feto raramente ocorre (REMINGTON et al., 2000), sugerindo que a imunidade materna naturalmente produzida contra *T. gondii* é suficiente para proteger o feto da transmissão vertical. Nos animais, verificou-se que ovelhas, após a primo-infecção, desenvolvem imunidade protetora contra a doença em infecções subseqüentes, portanto, o controle da doença pela vacinação pode ser uma meta viável (INNES et al., 2009).

As medidas para prevenção da infecção por *T. gondii* não têm sido suficientes para evitar a ocorrência da toxoplasmose. Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas contra toxoplasmose parece constituir uma alternativa importante para o controle da doença (JENKINS, 2001), porém sua elaboração ainda representa um desafio para a pesquisa e reforçam a pertinência de estudos que contribuam em gerar a tecnologia necessária para o uso de vacina contra esta parasitose, de grande relevância para a medicina veterinária e humana.

Objetivou-se estudar a influência da vacinação no puerpério fisiológico, utilizando-se como modelo animal ratas Wistar, avaliando-se a quantificação de *T. gondii* na musculatura esquelética, cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, a transmissão congênita e possível eliminação do agente pelo leite, empregando-se a técnica de PCR em tempo real na quantificação de parasitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O protozoário *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório, é capaz de infectar uma ampla variedade de animais de sangue quente, incluindo os humanos, tornando-se um dos parasitos mais bem sucedidos em todo o mundo, com taxas de infecção que podem alcançar até 100% da população em diferentes regiões geográficas (BÓIA et al., 2008). Há também um amplo espectro de manifestação da doença, embora geralmente assintomática nos indivíduos imunocompetentes, cerca de 10 a 20% dos casos de infecção humana adquirida são sintomáticos, como os que apresentam a doença ocular ou os pacientes imunossuprimidos, como transplantados, submetidos a quimioterápicos ou portadores de HIV, que desenvolvem a doença neurológica, ocasionando sérios problemas de saúde pública (COSTA-SILVA e PEREIRA-CHIOCOLLA, 2010), com quadros clínicos de alta gravidade podendo levar à morte. Outra situação em que a infecção assume grande importância clínica são em gestantes, podendo ocasionar aborto espontâneo, nascimento prematuro, morte neonatal, ou sequelas severas no feto, como ocorre na Tétrade de Sabin, com retinocoroidite, calcificações cerebrais, hidrocefalia ou microcefalia e retardo mental, caso a infecção seja adquirida durante a gestação, principalmente durante os primeiros dois trimestres (AMENDOEIRA e CAMILLO-COURA, 2010). A frequência da toxoplasmose congênita humana se encontra entre 1-6/1000 crianças nascidas vivas, dependendo do país (REMINGTON e DESMONTS, 1990).

No Brasil as lesões oculares são as mais frequentes apresentações clínicas da toxoplasmose congênita. Esta forma da doença apresenta uma prevalência alta, de 1/3.000 nascidos vivos, quando comparada a outros países (NETO et al., 2000). Mesmo em adultos observam-se altas taxas (21%) de lesões oculares nos indivíduos infectados, a maioria delas devidas a infecções adquiridas após o nascimento, o que mostra a capacidade do parasito em causar doença mesmo em indivíduos imunocompetentes (SILVEIRA et al., 2001).

Além do aspecto de saúde pública, a toxoplasmose também se destaca pela elevada importância veterinária e zootécnica, pelo comprometimento clínico em animais de companhia e, principalmente, pelos prejuízos gerados

aos animais de produção, cuja principal repercussão clínica é o aborto (WYSS et al., 2000; O'ROUKE, 2002), além de servirem como notável fonte de infecção tanto para humanos como para outros animais carnívoros (KIJLSTRA e JONGERT, 2008, 2009).

A despeito da ampla diversidade de hospedeiros do *T. gondii,* todos os animais homeotérmicos, apenas os felídeos desenvolvem a fase sexuada do ciclo, o que leva à descrição desses mamíferos como hospedeiros definitivos do agente. O homem e outros mamíferos, juntamente com as aves, são considerados hospedeiros intermediários, pois nesses ocorre somente desenvolvimento do ciclo assexuado do parasito (KAWAZOE, 2011).

Pela sua versatilidade, *T. gondii* pode ser infectante em qualquer estágio evolutivo, seja, taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos, fato que amplia muito os riscos de infecção para animais e humanos (ARAÚJO et al., 1998) e justifica o sucesso do parasitismo. Os taquizoítos estão envolvidos na forma congênita de infecção, pela transmissão transplacentária. Os esporozoítos alcançam os hospedeiros pela ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos eliminados exclusivamente pelas fezes de felídeos, enquanto que os bradizoítos podem ser adquiridos pela ingestão de tecidos dos hospedeiros infectados com cistos do parasito (SUKTHANA, 2006).

Segundo Tenter et al. (2000), o ciclo do parasito é heteroxeno facultativo, pois pode ser indefinidamente mantido pela ingestão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários, mesmo na ausência do hospedeiro definitivo, e também pela transmissão de oocistos entre os hospedeiros definitivos, mesmo na ausência dos hospedeiros intermediários.

Este complexo ciclo de vida do *T. gondii*, permite que indivíduos de diferentes etnias, costumes alimentares e socioculturais distintos sejam atingidos por esta doença por diferentes vias de transmissão (HALL et al., 1999).

Um estudo multicêntrico realizado na Europa, os quais incluíam países como Bélgica, Dinamarca, Itália, Noruega, Suíça e o Reino Unido, atribuíram o consumo de carne inadequadamente cozida como principal fator de risco para a infecção. Segundo o estudo, as principais carnes apontadas foram as de suíno e ovino (COOK et al., 2000). O consumo frequente de carne crua ou mal cozida também foi associado a soropositividade para *T. gondii* em indivíduos

adultos e saudáveis na França e Iugoslávia (BOBIC et al., 1996; BARIL et al., 1999).

No Brasil, dados provenientes de genotipagem de cepas isoladas de diversas fontes indicam uma alta frequência de cepas recombinantes, o que evidencia que a maior parte das infecções ocorrem pela ingestão de oocistos, fortalecendo a importância dos felinos e da contaminação ambiental na transmissão e manutenção da infecção (FERREIRA et al., 2006). No Brasil, o consumo de água não tratada tem sido apontado como importante fator de risco para aquisição da toxoplasmose (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Outro estudo apontou o grau de escolaridade como fator de proteção a toxoplasmose, com taxas de soropositividade menor em mulheres que tinham acima de nove anos de escola (VARELLA et al., 2003). Moradia em zona rural e contato com solo também são apontados como fatores de risco para doença, no Brasil (SPALDING et al., 2005).

Outra forma potencial de transmissão de *T. gondii*, é a ingestão de leite de cabra e, possivelmente, de outros animais produtores de leite, embora não comumente isolados nestes produtos. A transmissão pela amamentação não foi comprovada ainda em humanos, embora haja referências na literatura da infecção humana a partir do leite materno (BONAMETTI et al., 1997), e de leite de cabra não processado (SACKS et al., 1982), já tendo sido detectado o parasito no leite de alguns mamíferos (CHAMBERLAIN, 1953), inclusive em ovelhas (CAMOSSI et al., 2011).

Entretanto, na maioria das vezes, não se sabe qual destas vias é epidemiologicamente mais importante, sendo provável que as fontes principais de infecção para *T. gondii* e as vias de transmissão sejam diferentes em populações humanas com hábitos culturais e alimentares distintos (TENTER et al., 2000).

Seguindo-se à infecção oral por qualquer uma das formas infectantes, o parasito invade ativamente as células epiteliais intestinais, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo, com multiplicação do parasito por endodiogenia, até romper ativamente ou sair ativamente, infectando células vizinhas e via linfática e hematogênica disseminando-se para outros órgãos e invadindo vários tipos diferentes de células nucleadas do hospedeiro, sofrendo então novas

endodiogenias. Essa fase inicial na qual ocorre uma rápida multiplicação dos taquizoítos caracteriza a fase aguda da doença (BARRAGAN e SIBLEY, 2003).

Os enterócitos infectados pelo *T. gondii* respondem à infecção pela secreção de quimiocinas e citocinas que atraem leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK) para o local da infecção, sendo que os neutrófilos estão entre as primeiras células a chegarem ao local (BUZONI-GATEL et al., 2006). As células polimorfonucleares no local da infecção podem participar do recrutamento e ativação de outras células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas.

Portanto, são os glóbulos brancos as células mais importantes na resposta imune. Em um primeiro momento os fagócitos (macrófagos, polimorfonucleares, monócitos e células citotóxicas NK) de maneira inespecífica freiam o parasito, e a seguir, por meio da forte resposta celular Th1, os linfócitos (T e B) sensibilizados com o auxílio das imunoglobulinas anti-*Toxoplasma* desenvolvem uma resposta específica, que na maioria das vezes obriga o parasito a encistar-se nos tecidos, passando para um estágio de latência ou cronicidade, no qual é vigiado pelo sistema imunológico (CAMARGO, 1995).

A resposta imune específica é desencadeada pela ativação inicial do sistema imune devido à apresentação de antígenos de *T. gondii* aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas e os macrófagos (FILISETTI e CANDOLFI, 2004). A apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4+ e T CD8+, induz a diferenciação do fenótipo Th em Th1 efetor. Segundo Araújo (1991), a população de linfócitos T CD4+ é essencial para o desenvolvimento da resistência em camundongos durante a fase inicial da infecção. Linfócitos Th1 CD4+ e os linfócitos T citotóxicos CD8+ são os principais envolvidos na resistência do hospedeiro à infecção por *T. gondii,* pois agem de forma sinérgica fornecendo uma imunidade protetora que permite a sobrevivência do mesmo durante a infecção crônica (GAZZINELLI et al., 1991). Os linfócitos T são fontes críticas de IFN-γ durante o estágio crônico da infecção, e essa citocina é importante para prevenir a reativação do parasito e o desenvolvimento de encefalite (GAZZINELLI et al., 1992). Os linfócitos T

CD8+, ativados pela IL-12 secretada pelos linfócitos T CD4+, exercem uma atividade citotóxica contra células infectadas com *T. gondii* (SUBAUSTE et al., 1991). A resposta imune induzida no hospedeiro também varia de acordo com a cepa de *T. gondii*. Estudos demonstram que cepas virulentas causam infecções letais por induzir uma produção extremamente elevada de citocinas pró-inflamatórias, que se tornam prejudiciais ao hospedeiro ao lesar tecidos parasitados ou normais. Já os animais infectados com cepa avirulenta produzem níveis moderados de IFN-γ, IL-12 e TNF-α, o que acarreta no controle da replicação dos parasitos com alterações teciduais mínimas (MORDUE et al., 2001).

T. gondii também induz a uma imunidade humoral nos indivíduos infectados, estimulando a produção de anticorpos do tipo IgM, IgG, IgA e IgE. Os anticorpos atuam nos taquizoítos extracelulares liberados após a lise de uma célula infectada. Esses anticorpos limitam a replicação do parasito, promovendo a lise do taquizoíto pela ativação da via do complemento e também pela opsonização dos parasitos e do aumento da ação fagocitária dos macrófagos (FILISETTI e CANDOLFI, 2004). Esses mecanismos não oferecem proteção contra parasitos intracelulares, mas anticorpos como IgA secretora podem interferir com a interação inicial do parasito com as células hospedeiras das mucosas, no intestino (ROBERTS e MCLEOD, 1999).

Com o estabelecimento da resposta imune do hospedeiro contra o parasito, os taquizoítos sofrem diferenciação celular para bradizoítos e iniciam uma segunda fase do desenvolvimento que resulta na formação de cistos teciduais. Dentro dos cistos teciduais, os bradizoítos se multiplicam lentamente por endodiogenia e, essa fase da infecção, pode persistir por toda a vida do hospedeiro, caracteriza a fase crônica da toxoplasmose. Esses cistos teciduais são encontrados principalmente em tecidos neural e muscular, incluindo sistema nervoso central, olhos, músculo esquelético e cardíaco, contudo também podem ser encontrados nas vísceras. Apesar de a fase crônica persistir por toda a vida do hospedeiro, os cistos teciduais podem romper-se periodicamente, por queda da imunidade do hospedeiro, com invasão de novas células e formação de novos cistos teciduais (DUBEY et al., 1998).

Apesar das tentativas do hospedeiro em conter a infecção, o *T. gondii* pode desenvolver várias estratégias para suprimir o sistema imune: 1) invade, persiste e cresce em diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos não ativados; 2) suprime as defesas do hospedeiro pela regulação da produção de fatores solúveis como o IFN-γ; 3) desfaz a ligação de imunoglobulinas da sua superfície (CHANNON e KASPER, 1996; ROZENFELD et al., 2003); e 4) interfere nos mecanismos de apoptose das células hospedeiras infectadas e não infectadas (LÜDER et al., 2001). Uma consideração importante para vacinas contra parasitos é a complexidade das doenças parasitárias, além dos mecanismos de evasão. A resposta imune às infecções por parasitos, ao contrário das virais e bacterianas, tendem a ser crônicas e associadas à imunodepressão ou resposta imune insuficiente.

O equilíbrio entre a supressão da resposta imune e a sua ativação relaciona-se à presença de milhões de pessoas assintomáticas e cronicamente infectadas pelo parasito no mundo (DENKERS et al., 2003).

O desenvolvimento de vacinas contra *T. gondii* é uma possibilidade viável já que indivíduos naturalmente expostos ao parasito podem produzir resposta imune intensa e duradoura, capaz de proteger o hospedeiro contra subsequentes reinfecções (DENKERS e GAZZINELI, 1998).

A imunidade prévia à infecção com *T. gondii* poderia impedir a formação e liberação dos oocistos pelos felinos, prevenir a formação de cistos teciduais na carne dos animais destinados ao consumo e sua transmissão por via oral, evitando o desenvolvimento de um estado de portador assintomático passível de reagudização nos humanos. Uma vacina também poderia diminuir a ocorrência de toxoplasmose aguda em mulheres gestantes e em fêmeas prenhes de rebanhos destinados a produção, impedindo a transmissão transplacentária do parasito e suas sérias consequências, como minimizar as perdas reprodutivas por aborto (ALEXANDER et al., 1996).

Ainda mais, já foi demonstrado que o mesmo grau de resposta pode ser obtido com a administração de formas atenuadas do parasito. Esse é o caso da “Toxovax”, uma vacina comercial para ovinos que foi desenvolvida com a cepa S48, não formadora de cistos, que é utilizada para fins veterinários. Apesar dos altos custos, do baixo período de proteção, dos riscos de infecções humanas

acidentais e dos efeitos colaterais, a imunidade conferida pela mesma é capaz de evitar a transmissão congênita do parasito e consequente abortamento em ovinos (BUXTON e INNES, 1995).

As vacinas atenuadas induzem uma resposta protetora bem mais eficiente em comparação com vacinas mortas, pois a imunidade protetora envolve a estimulação da resposta mediada por células, principalmente as células T CD8+ e produção de IFN-γ, os quais são produzidos quando há o processamento endógeno e apresentação do antígeno via MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe I. Isso ocorre eficientemente quando os antígenos são processados vivos, explicando a maior eficiência das vacinas vivas em relação a preparação de antígenos mortos (INNES e VERMEULEN, 2006). Entretanto, seu uso veterinário não é amplamente aceito porque pode apresentar efeitos colaterais indesejáveis no tocante a biossegurança, como risco de infecção pela reversão de virulência ou pelo surgimento inesperado de mutações, além do curto período de prateleira e custo elevado de produção em grande escala (BOUT et al., 2002; EISSA et al., 2012).

O uso de vacinas vivas ou atenuadas em humanos é improvável dado o fato de que os taquizoítos presentes em sua composição estão vivos e podem estabelecer infecções crônicas ou reverter a um estado patogênico e causar doença aguda. Devido a esse fato, as pesquisas para o desenvolvimento de vacinas humanas contra toxoplasmose concentram-se na identificação de imunógenos e delineamento de protocolos de imunização que utilizem antígenos recombinantes definidos (MISHIMA et al., 2001, INNES e VERMEULEN, 2006).

A utilização de taquizoítos tratados com radiação ionizante, já foi utilizada em camundongos, com bons resultados, produzindo imunidade semelhante a infecção natural. A radiação promove a produção de radicais livres, com efeito direto sobre a membrana celular, o cromossomo, alvo principal da radiação, sem interferir nas funções vitais do parasito, como nos processos biológicos e metabólicos, permitindo que parasitos irradiados mantenham a mesma capacidade imunogênica que organismos intactos, sem os prejuízos que estes poderiam causar, ou seja, promove essencialmente a

perda da capacidade reprodutiva, impedindo a multiplicação por endodiogenia na célula hospedeira, mantendo o potencial imunogênico adequado (HIRAMOTO et al., 2002). Candidatos vacinais orais e nasais tem sido desenvolvidos com resultados satisfatórios, porém contra desafios com cepas homólogas ou uniformes (GALISTEO, 2008; IGARASHI et al., 2008).

Assim, é fundamental entender se a imunidade gerada por essa vacina é suficiente para manter o parasito quiescente, sem causar doença, ou seria capaz de eliminá-lo dos tecidos, fato que interessaria muito a medicina veterinária, principalmente em animais destinados ao consumo humano. A redução da infecção nos animais está diretamente relacionada com o declínio da incidência da toxoplasmose humana, e seu controle tornou-se um desafio para a saúde pública em todo o mundo, sinalizando a prioridade em buscar na vacinação uma estratégia para conter a infecção, ainda que, seu uso, com variadas possibilidades e promessas, ainda não foi alcançado, há a necessidade de continuar a procura pelo antígeno ideal.

3. OBJETIVOS

Geral:

A proposta do estudo foi verificar a proteção induzida por taquizoítos irradiados de *T. gondii* em ratas no período da gestação, e expostas a diferentes formas infectantes do parasito.

Específicos:

Verificar a proteção induzida por taquizoítos irradiados contra formação de cistos teciduais no cérebro;

Verificar a proteção induzida por taquizoítos irradiados contra transmissão congênita;

Verificar a proteção induzida por taquizoítos irradiados contra eliminação do agente pelo leite;

Estudar a imunidade celular intestinal e sistêmica contra o *T. gondii*, induzida por taquizoítos irradiados com 255Gy;

Estudar a imunidade humoral (IgA, IgM e IgG) sérica contra o *T. gondii*, induzida por taquizoítos irradiados;

Quantificar a carga parasitária na musculatura, cérebro, coração, fígado, pulmão e baço pela PCR quantitativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, NUPEZO, localizados no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu/SP. A irradiação da preparação vacinal foi realizada no laboratório de Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear da Agricultura (CENA-ESALQ-USP), Piracicaba/SP.

4.1. Animais de experimentação

Para os experimentos I e II foram utilizadas ratas da linhagem Wistar albinas, obtidas do Biotério da Universidade de Campinas – CEMIB/UNICAMP, com 40 dias de idade, as ratas ficaram 60 dias em adaptação até atingirem 100 dias, assegurando assim a maturidade sexual dos animais para posterior acasalamento. Após acasalamento, as ratas foram mantidas em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada e receberam ração comercial e água *ad libitum*.

Para a produção dos antígenos necessários para imunização, desafio e provas sorológicas foram utilizados camundongos Swiss, albinos, de 30 dias de idade, com cerca de 30 a 40 g. Os camundongos foram obtidos do Biotério Central da Unesp – Botucatu.

Os animais foram eutanasiados em câmara saturada com vapor de isofluorano de acordo com os “Princípios de Ética em Experimentação Animal” (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, protocolo 42/2010.

4.2. Descrição dos experimentos

Foram realizados dois experimentos distintos e independentes, compostos por oito grupos experimentais cada. Foram assim divididos para que em um dos experimentos se avaliasse a transmissão congênita, sendo necessária a eutanásia dos neonatos, imediatamente após o nascimento. No segundo experimento, avaliou-se a detecção do agente no leite, sendo

necessária a permanência dos neonatos, por 21 dias após o parto, para que houvesse o estímulo da lactação possibilitando a colheita de leite.

Experimento I:

Verificar a proteção conferida pela vacinação em relação a carga parasitária tecidual em cérebro, musculatura, coração, pulmão, baço, fígado, além da transmissão congênita de *T. gondii*.

Grupo 1: seis ratas imunizadas e desafiadas com 10^2 bradizoítos/mL (ME-49) de *T. gondii* (IDB)*;*

Grupo 2: seis ratas, não imunizadas, desafiadas com 10^2 bradizoítos/mL (ME-49) de *T. gondii* (NIDB)*;*

Grupo 3: seis ratas imunizadas e desafiadas com 10^2 oocistos/mL (ME-49) de *T. gondii* (IDO)*;*

Grupo 4: seis ratas, não imunizadas, desafiadas com 10^2 oocistos/mL (ME-49) de *T. gondii* (NIDO)*;*

Grupo 5: seis ratas imunizadas e desafiadas com 10^2 taquizoítos/mL (RH) de *T. gondii* (IDT)*;*

Grupo 6: seis ratas, não imunizadas, desafiadas com 10^2 taquizoítos/mL (RH) de *T. gondii* (NIDT)*;*

Grupo 7: seis ratas imunizadas (I);

Grupo 8: seis ratas controle, não desafiadas e não imunizadas (C).

Quadro 1. Desenho experimental dos grupos analisados no estudo I.

Variantes	**Grupos experimentais – experimento 1**							
	Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**	**Grupo 4**	**Grupo 5**	**Grupo 6**	**Grupo 7**	**Grupo 8**
Sexo	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas
Número ratas	seis	seis	seis	seis	seis	seis	seis	seis
Imunização	sim	não	sim	não	sim	não	sim	não
Desafio	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
Dose infecção	$1x10^2$	$1x10^2$	$1x10^2$	$1x10^2$	$1x10^2$	$1x10^2$	-	-
Forma infectante	bradizoíto ME-49	bradizoítos ME-49	oocisto ME-49	oocisto ME-49	taquizoíto RH	taquizoíto RH	-	-

Experimento II:

Verificar a proteção conferida pela vacinação em relação a carga parasitária tecidual em cérebro, musculatura, coração, pulmão, baço, fígado e detecção do agente no leite.

Grupo 1: cinco ratas imunizadas e desafiadas com 10^4 bradizoítos/mL (ME-49) de *T. gondii* (IDB)*;*

Grupo 2: cinco ratas, não imunizadas, desafiadas com 10^4 bradizoítos/mL (ME-49) de *T. gondii* (NIDB)*;*

Grupo 3: cinco ratas imunizadas e desafiadas com 10^4 oocistos/mL (ME-49) de *T. gondii* (IDO)*;*

Grupo 4: cinco ratas, não imunizadas, desafiadas com 10^4 oocistos/mL (ME-49) de *T. gondii* (NIDO)*;*

Grupo 5: cinco ratas imunizadas e desafiadas com 10^4 taquizoítos/mL (RH) de *T. gondii* (IDT)*;*

Grupo 6: cinco ratas, não imunizadas, desafiadas com 10^4 taquizoítos/mL (RH) de *T. gondii* (NIDT)*;*

Grupo 7: cinco ratas imunizadas (I);

Grupo 8: cinco ratas controle, não desafiadas e não imunizadas (C).

Quadro 2. Desenho experimental dos grupos analisados no estudo II.

Variantes	**Grupos experimentais – experimento 2**							
	Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**	**Grupo 4**	**Grupo 5**	**Grupo 6**	**Grupo 7**	**Grupo 8**
Sexo	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas	fêmeas
Número ratas	cinco	cinco	cinco	cinco	cinco	cinco	cinco	cinco
Imunização	sim	não	sim	não	sim	não	sim	não
Desafio	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	não
Dose infecção	$1x10^4$	$1x10^4$	$1x10^4$	$1x10^4$	$1x10^4$	$1x10^4$	-	-
Forma infectante	bradizoíto ME-49	bradizoítos ME-49	oocisto ME-49	oocisto ME-49	taquizoíto RH	taquizoíto RH	-	-

4.3. Período de adaptação e manutenção das ratas

As ratas tinham idade inferior ao período de maturidade sexual, que é de 100-120 dias de idade. Em virtude disso, aguardou-se a maturidade dos animais, em período de adaptação, para iniciarem as atividades experimentais.

Para o experimento I foram adquiridas 49 fêmeas e 24 machos da linhagem Wistar livres de patógenos específicos (SPF). Cada grupo do experimento I foi composto de cinco ratas, com um indivíduo extra por grupo.

Como ao final deste experimento não houve óbitos, os animais reservas de cada grupo foram incluídos nas análises e na interpretação dos resultados, constituindo-se seis ratas. Após o término das atividades experimentais do experimento I, iniciou-se o experimento II e neste, cada grupo ficou definido por cinco indivíduos, devido ao óbito das ratas extras.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (41x34x16cm) com tampa metálica em aço inoxidável, bebedouros plásticos com bico metálico. As gaiolas foram mantidas em infectório e dispostas em prateleiras. Os animais foram separados em seus respectivos grupos, devidamente identificados com etiquetas no exterior da caixa (Figura 1).

Como o período experimental dos dois experimentos, desde a chegada das ratas até a eutanásia, compreendeu 10 meses, a temperatura de 22^{o}C foi mantida no infectório com auxílio de ar condicionado no verão, e no inverno com aquecedor elétrico.

A água e a ração comercial foram autoclavadas previamente e fornecidas aos animais *ad libidum*. A forragem das caixas, composta por maravalha de pinus, também foi autoclavada previamente a utilização.

Figura 1. Alojamento das ratas em gaiolas de polipropileno. Botucatu, SP, 2013.

Durante o período de adaptação as ratas foram identificadas com brincos permanentes, fixados na extremidade da orelha, em área livre de vasos sanguíneos (Figura 2). A antissepsia da área foi realizada com iodopovidine e a anestesia local foi garantida pela aplicação de pomada anestésica a base de lidocaína e prilocaína (enla® creme).

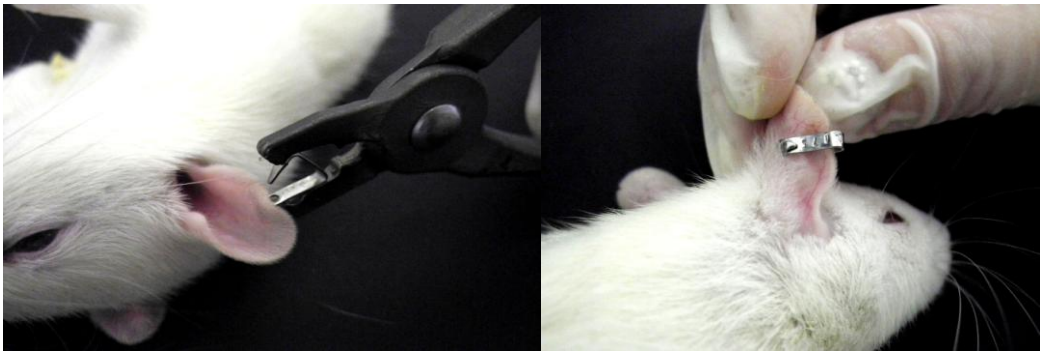


Figura 2. Colocação de brincos de identificação em rata do experimento. Botucatu, SP, 2013.

4.4. Parasitos

Os taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii*, utilizados nos desafios foram mantidos rotineiramente nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses da FMVZ, UNESP, Botucatu. Os oocistos de *T. gondii* foram cedidos pelo Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual de Londrina (Figura 3).

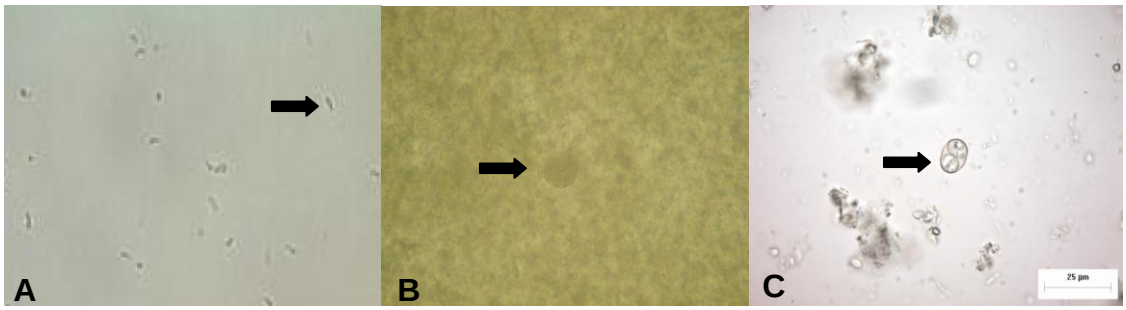


Figura 3. Formas infectantes de *T. gondii*: taquizoítos (A), cistos (B) e oocistos (C). Botucatu, SP, 2013.

Taquizoítos

Para produção de taquizoítos foi utilizada a cepa RH de *T. gondii*, isolada por Sabin em 1939 (SABIN, 1941), virulenta em camundongos, pertencente ao genótipo I e mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss, albinos, com 1 mL de exsudato peritoneal de camundongo previamente inoculado.

Bradizoítos

Para produção de bradizoítos de *T. gondii*, camundongos Swiss albino, fêmea, de 30 dias de idade foram inoculados com 40 cistos da cepa cistogênica ME-49 (genótipo II), avirulenta em camundongos, por via subcutânea (Figura 4). Esses cistos foram previamente obtidos de outros camundongos anteriormente infectados. A contagem dos cistos foi realizada a partir do macerado cerebral obtido dos camundongos cronicamente infectados, e então inoculados em outros camundongos. Do 3º ao 12º dia pós-inoculação foi administrada sulfadiazina na água (400 mg sulfadiazina em 1 litro de água). Após 60º dia de infecção, os bradizoítos foram recuperados para utilização no desafio experimental das ratas.

A suspensão de cérebro dos animais contendo cistos foram então homogeneizados em solução de Hanks (HBSS) com 30% de dextran, centrifugado a 3000 *g* a 4^{o}C por 10 minutos e o pellet ressuspendido em HBSS (BOOTH et al., 1996). Procedeu-se a digestão pela pepsina para liberação dos bradizoítos do interior dos cistos, de acordo com o protocolo descrito por Dubey (1998). A quantidade de bradizoítos foi mensurada por microscopia óptica (Ax10® - Zeiss) em câmara de Neubauer.

Originalmente, foi proposto o desafio das ratas com cistos da cepa ME-49, entretanto, foi necessária a padronização da dose infectante com bradizoítos, devido a precisão do número de parasitos inoculados. Durante a avaliação dos cistos cerebrais de camundongos infectados, verificou-se diferenças entre os seus tamanhos, o que significa que há cistos com grande número de bradizoítos e outros com menor número de bradizoítos. Se fossem fornecidos as ratas, haveria grande diferença na dose infectante entre os animais, prejudicando a interpretação e comparação dos resultados. Foram fornecidos, então, bradizoítos na dose de 10^2 no experimento I e de 10^4 no experimento II (Costa e Langoni, 2010).

FIGURA 4. Camundongos inoculados com cistos de *T. gondii* (ME-49). Botucatu, SP, 2013.

Oocistos

Os oocistos foram obtidos de felinos experimentalmente infectados com cistos da cepa ME-49. As fezes foram colhidas do terceiro até o 20° dia após o desafio, sendo utilizado o método Sheather para recuperação dos oocistos e, posteriormente submetidos a esporulação (ZULPO, 2010).

Após esporulação os oocistos foram lavados com solução fisiológica 0,9%, por centrifugações sucessivas com descarte do sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 1 mL de solução salina e acondicionado em temperatura de refrigeração até a utilização. Os oocistos foram identificados por critérios morfológicos e biométricos em microscópio óptico binocular (Eclipse E200® - Nikon) equipado com ocular micrométrica e a contagem foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer.

4.5. Produção do inóculo vacinal

Para obtenção das preparações vacinais utilizou-se taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (genótipo I). A solução antigênica foi obtida de camundongos previamente inoculados intraperitonialmente, com 1 mL de suspensão rica em taquizoítos de *T. gondii*, a partir de lavados peritoneais, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma®)**,** e mantidos em banho de gelo durante todo o processo. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer antes de serem submetidos à irradiação (GALISTEO JÚNIOR, 2008).

4.6. Irradiação do inóculo

O inóculo contendo a suspensão de taquizoítos foi submetido à irradiação no laboratório de radioentomologia do Centro de Energia Nuclear da Agricultura (CENA-ESALQ-USP), Piracicaba, SP. Os taquizoítos receberam a irradiação em Irradiador Gammabeam 650 (Figura 5), na dose de 255 Gray (Gy) pela exposição de raios gama de uma fonte de ^{60}Co de forma homogênea (GALESTEO JÚNIOR et al., 2005; ZORGI et al., 2011). A taxa de dose foi de 179,53 KGy/h em temperatura ambiente e na presença de oxigênio, equivalente a 66,8 minutos de irradiação.

O grupo controle permaneceu na parte externa da fonte durante todo o tempo de irradiação. Após a irradiação acrescentou-se soro fetal bovino inativado, 50% do volume final, e 10% de DMSO ao volume final. A viabilidade da amostra foi avaliada e a suspensão com viabilidade maior que 95% foi ajustada para 10^8 taquizoíto.mL^{-1}. Em seguida foram aliquotadas no volume de 1 mL em tubos plásticos de congelamento e mantidos a – 80^oC durante 24 horas, e após transferidos para o nitrogênio líquido (-196^oC) onde permaneceram até o momento do uso (GALISTEO JÚNIOR, 2008).

Figura 5. Irradiador Gammabeam 650 (CENA/ESALQ). Piracicaba, SP.

4.7. Produção de antígeno para Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a produção de antígeno para as provas sorológicas, foi utilizada a cepa RH, mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss, albinos, com 30 dias de idade, com 30 a 40g, com 1mL de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente inoculados. Após três dias os animais foram eutanasiados e colheu-se o exsudato peritoneal, inoculando-se 10 mL de solução fisiológica 0,9% estéril, por animal, aspirando-se o conteúdo em seguida. Ao exsudato peritoneal rico em taquizoítos misturou-se igual volume de solução formalina 2%, obtendo-se uma suspensão de exsudato-formol a 1%. Esta foi transferida para um tubo de centrífuga e incubada em estufa bacteriológica a 37ºC por 30 minutos, agitando-a por inversão do tubo, a cada 10 minutos. A seguir, centrifugou-se a 1.600*g* por cinco minutos, desprezou-se o sobrenadante, e o sedimento foi ressuspendido em 2 mL de solução salina 0,85%, centrifugando-se a 1600*g* por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado, ressuspendendo-se o sedimento em solução salina 0,85% até se obter de 20 a 30 parasitos por campo microscópico.

A fixação do antígeno na lâmina foi procedida transferindo-se 10µL da solução antigênica sobre cada orifício da lâmina especial de vidro para a RIFI e aspirando-se a seguir o excesso, restando somente uma fina película sobre cada orifício após secagem à temperatura ambiente. As lâminas assim preparadas foram mantidas em laminários a -20ºC, até o momento do uso, mantendo-se em estoque.

.

4.8. Anestesia

Todos os procedimentos de colheitas de sangue e leite, vacinações e desafios foram realizados com os animais em completa analgesia. As ratas foram retiradas das caixas pela base da cauda em movimento breve e suave e colocadas em um recipiente fechado, contendo algodão embebido no anestésico inalatório isoflurano. Quando a rata passou para plano de anestesia superficial, foi então retirada do recipiente e os anestésicos quetamina e xilazina foram aplicados pela via intraperitoneal, com auxílio de agulha de insulina, na dose de 50 mg/Kg e 5 mg/Kg, respectivamente. A duração anestésica foi de aproximadamente 20 minutos, suficientes para realizar a

tricotomia do tórax, antissepsia e punção cardíaca. Após o procedimento, aguardou-se o retorno anestésico, com os animais devidamente aquecidos, envoltos em tecido plush (Figura 6).

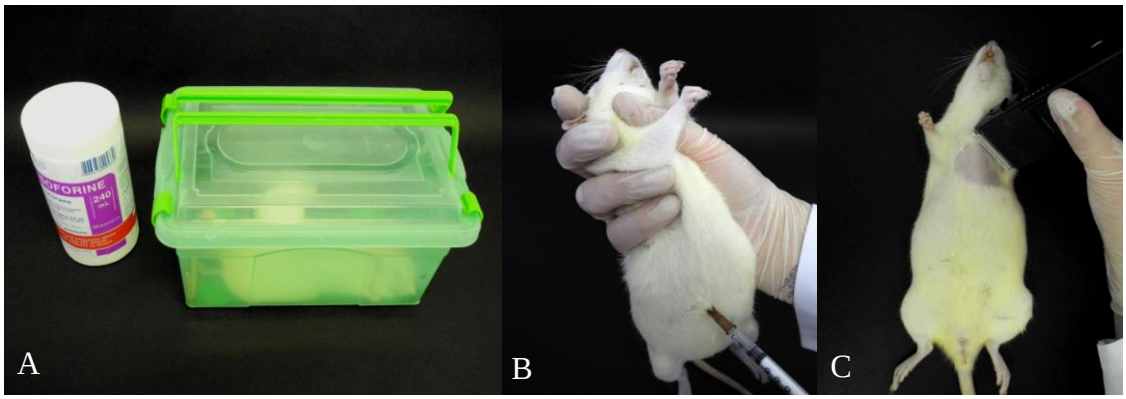


Figura 6. Rata em recipiente saturado com isoflurano (A). Aplicação intraperitoneal dos anestésicos quetamina e xilazina (B). Tricotomia da região do tórax (C). Botucatu, SP, 2013.

4.9. Colheitas de sangue

As colheitas de sangue foram realizadas semanalmente. Inicialmente foi proposta a punção da veia caudal, mas devido à hipotensão gerada pela anestesia a retirada do sangue foi lenta e induzia a formação de coágulos, impossibilitando a leitura adequada do leucograma. Foi necessária a punção intracardíaca, com auxílio de agulha de insulina acoplada em seringa de 1 mL, permitindo a retirada de 800 μL de sangue em poucos segundos (Figura 7). Deste volume, 500 μL foram depositados em tubo sem anticoagulante, para posteriormente realizar a dessora. O soro sanguíneo foi obtido por centrifugação a 1600*g* por 10 minutos, transferido para microtubos identificados e estocados a –20^{o}C até a realização dos exames sorológicos.

Os 300 μL de sangue restantes foram depositados em microtubos com EDTA (BD microtainer®), para em seguida determinar a contagem total de leucócitos e confecção dos esfregaços sanguíneos.

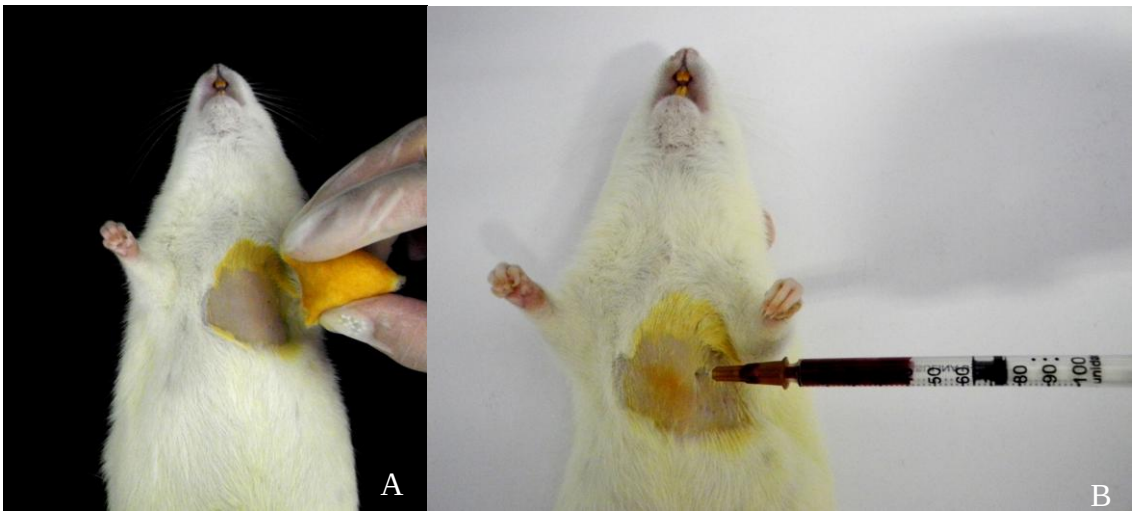


Figura 7. Antissepsia da região torácica (A). Punção intra-cardíaca para colheita de sangue (B). Botucatu, SP, 2013.

4.10. Vacinação

As ratas pertencentes aos grupos imunizados (G1-G3-G5-G7) de ambos os experimentos, receberam três doses da vacina (10^7 parasitos/animal) com intervalo de 15 dias, via oral, por gavagem e tendo como veículo hidróxido de alumínio. Ao final das vacinações cada rata recebeu 30 milhões de taquizoítos irradiados. Os inóculos vacinais foram mantidos a -196 ^{o}C em botijões de nitrogênio líquido e retirados somente no momento da utilização. A imunização ocorreu antes do período de reprodução das ratas.

4.11. Reprodução

Sete dias após a última aplicação da vacina, as ratas foram colocadas para reprodução. As fêmeas foram mantidas com os machos por dez dias, e neste período realizou-se o rodízio de machos para garantir a cobertura da fêmea, caso houvesse a rejeição da rata por algum macho. A cópula foi constatada pela visualização de tampão vaginal.

4.12. Desafios orais

As ratas pertencentes aos grupos imunizados e desafiados (G1-G3-G5) e os grupos apenas desafiados (G2-G4-G6) receberam os desafios orais após sete dias da constatação da cópula, ou quinze dias após a última dose da vacina. Considerando que a duração da gestação em ratas é de 21 dias, a

infecção foi realizada no primeiro terço da prenhez. Para o experimento I, as doses da infecção para o G1 (imunizado) e G2 (não imunizado) foi de 10^2 bradizoítos/mL da cepa ME-49 de *T. gondii*; para os grupos G3 (imunizado) e G4 (não imunizado) as ratas foram inoculadas com 10^2 oocistos/mL ME-49 de *T. gondii,* G5 (imunizado) e G6 (não imunizado) foram inoculados com 10^2 taquizoítos/mL da cepa RH de *T. gondii.*

Para o experimento II foi necessário ajustar as doses infectantes, e cada forma infectante foi administrada na dose de 10^4 parasitos/mL. O objetivo da segunda pesquisa foi verificar se a vacina seria capaz de impedir a eliminação galactogênica do agente e para tal avaliação era necessário uma dose em que fosse possível a eliminação do toxoplasma pelo leite. Esta modificação se justificou pelos resultados de pesquisa anterior (COSTA e LANGONI, 2010), que mostrou a eliminação pelo leite com a dose de 10^4 parasitos.

4.13. Parto

As ratas foram observadas diariamente, quatro vezes ao dia, para verificação de sinais de parto, e em caso positivo, foram então observadas continuadamente até a parição, que ocorria normalmente no fim de tarde. No experimento I, imediatamente após o nascimento, os neonatos foram retirados e eutanasiados em recipiente saturado com isoflurano. No experimento II, metade da ninhada foi eutanasiada imediatamente após o nascimento, para avaliar a transmissão congênita, e a outra metade foi eutanasiada somente após o período de lactação para se avaliar a possibilidade de transmissão galactogênica.

4.14. Colheita de leite

Este procedimento foi realizado apenas nas ratas pertencentes ao experimento II. Com o animal anestesiado, aplicou-se 1 mL de ocitocina pela via intraperitoneal, realizou-se antissepsia e massagem das glândulas mamárias e o leite secretado foi colhido com auxílio de pipeta manual, até atingir o volume de 250 μL (Figura 8). A colheita foi realizada duas vezes por semana em cada rata em lactação. Inicialmente havia sido proposta a colheita em dias alternados mas em virtude da constante anestesia dos animais, tanto

para colheita de sangue como de leite, algumas ratas morreram. Como se trabalhou com animais extras por grupo, o número de indivíduos por grupo (n=5) não foi prejudicado. Para evitar mais perdas, foi necessário limitar as colheitas de leite, a duas vezes por semana.

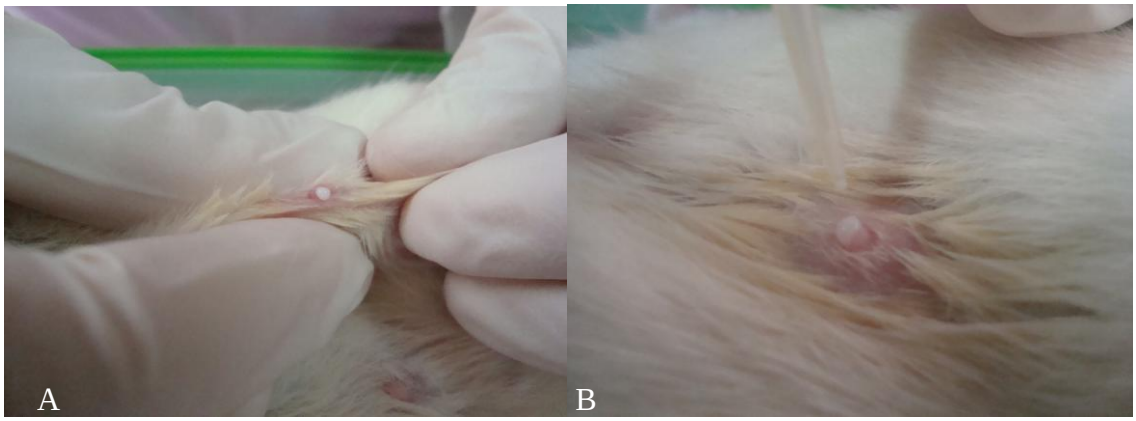


Figura 8. Massageamento da glândula mamária (A). Colheita de leite com auxílio de ponteira acoplada em pipeta manual (B). Botucatu, SP, 2013.

4.15. Colheita de órgãos

Ao fim do experimento, as ratas foram eutanasiadas e os órgãos foram retirados imediatamente após abertura (Figura 9). Além da musculatura e cérebro, foram incluídas nas análises o coração, baço, pulmão e fígado. Na proposta inicial sugeriu-se avaliar a carga parasitária do tecido muscular como uma única amostra, ou seja, o DNA seria extraído a partir de 400 μL de todo o tecido muscular corpóreo. Para possível aumento na chance de detecção do parasito dividiu-se a musculatura em porções menores: musculatura de membro anterior esquerdo, membro anterior direito, membro posterior esquerdo, membro posterior direito, dorso esquerdo e dorso direito, e então o DNA foi extraído a partir de 400 μL de cada porção muscular. Todos os órgãos foram lavados com solução fisiológica e acondicionados em sacos plásticos estéreis e congelados a -80^{o}C até a realização dos procedimentos de biologia molecular. Para cada rata, cinco órgãos foram analisados e seis porções musculares, totalizando 11 amostras teciduais por rata. Um total de 528 amostras foram processadas na PCR convencional para o experimento I e prosseguiu-se com estas amostras para a PCR quantitativa. No experimento II, um total de 440 amostras foram analisadas para ambas as técnicas moleculares.

Um fragmento de intestino delgado foi colhido após a abertura deste e foram fixados em formalina neutra tamponada a 4% por 24 horas. Após foram lavados por 12 horas em água corrente. Em seguida, as amostras foram seccionadas em pequenos fragmentos, colocadas em cassetes histológicos e mantidos em álcool 70^{o}GL, até a confecção das lâminas histológicas, processadas de acordo com as técnicas de rotina histológica e incluídas em parafina.

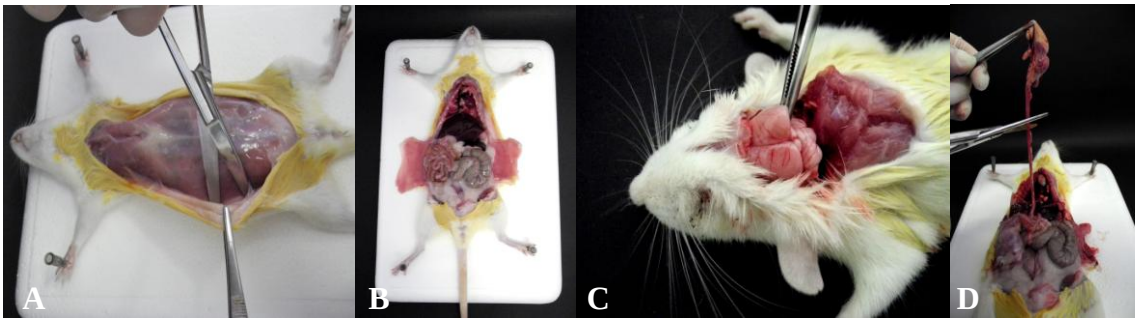


Figura 9. Abertura cavidade abdominal (A). Órgãos abdominais expostos (B). Abertura e retirada de cérebro (C). Colheita de fragmento de intestino delgado para histologia (D). Botucatu, SP, 2013.

4.16. Variáveis analisadas:

4.16.1. Procedimentos biomoleculares

4.16.1.1. *Extração de DNA*

Para o experimento I, foram processadas 528 amostras de tecidos de ratas e 309 amostras de tecidos de neonatos. Para o experimento II foram processadas 440 amostras de tecidos de ratas, 108 amostras de neonatos, 108 amostras de lactantes e 120 amostras de leite. Cada tecido foi macerado individualmente com auxílio de lâmina e bisturi, seguido de homogeneização com biospec, desta suspensão de tecido 200 mg foram utilizadas para extração.

O DNA foi extraído com utilização de kit comercial, Illustra Genomic Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE-Healthcare), como descrito a seguir. Pipetou-se 400 µl de cada suspensão de tecidos em microtubo estéril livre de DNAse e RNAse, acrescentou-se 50 µl de solução de lise 1 e 10 µL de proteinase K (20mg/m). Agitou-se em vórtex por 15 segundos e incubou-se a

56^{o}C por uma hora. Centrifugou-se a 2000 g por 10 segundos e foi acrescido 5 µl de RNAse e 500 µL de solução de lise 2. Agitou-se em vórtex por 15 segundos e manteve-se em temperatura ambiente por 10 minutos. Aplicou-se a amostra na coluna do tubo coletor. Prosseguiu-se com a centrifugação a 11000 g por 1 minuto. Adicionou-se novamente solução de lise 2 e centrifugou-se novamente a 11000 g por 1 minuto. Acrescentou-se 500 µL de tampão de lavagem. Centrifugou-se a 11000 g por 3 minutos. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se a coluna em microtubo estéril. Acrescentou-se 200 µL de tampão de eluição e centrifugou-se a 11000 g por 1 minuto. A solução permaneceu em geladeira por 24 horas para estabilização e a seguir foi procedida a amplificação do DNA, sendo 36 amostras do experimento amplificadas por dia.

4.16.1.2. *Determinação da sensibilidade analítica de detecção pela PCR convencional*

Antes do processamento das amostras, foi necessário determinar o limite mínimo de detecção da PCR para *T. gondii*. Para isso foram utilizadas amostras de água ultra pura contaminadas experimentalmente com uma suspensão de 10^6 taquizoítos/mL (cepa RH), contados em câmara de Neubauer. Realizou-se diluições seriadas com PBS 7,2 estéril nas concentrações aproximadas de 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0/parasitos/mL. Posteriormente, realizou-se a extração de DNA dessas amostras, prosseguiu-se com a amplificação e visualização das bandas em gel de agarose. O limite mínimo de detecção da reação de PCR para *T. gondii* foi de 100 parasitos/mL.

4.16.1.3. *Reação em Cadeia pela Polimerase*

A Reação em Cadeia pela Polimerase para a detecção de DNA de *T. gondii* nas amostras foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos TOX4, com sequência de bases 5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3' e TOX5 com sequência de bases 5'CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT3', segundo descrito por Homan et al. (2000), amplificando uma região de 529 pares de bases, presente repetidamente de 200-300 vezes no genoma do parasito.

Para a amplificação cada tubo de reação de 0,2mL recebeu volume total de 25µL contendo tampão de reação (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0,), $MgCl_2$ (1,5mM), solução de desoxirribonucleotídeos (0,2 mM), 10ρM de cada

oligonucleotídeo TOX4 e TOX5, 0,2U/µL de Platinum Taq-polimerase (Invitrogen), O volume da reação foi corrigido com água ultrapura q.s.p. para 23 µL e adicionados 2 µL de DNA (10*n*g/µL). A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), como segue no Quadro 1.

Quadro 3. Etapas da amplificação das regiões codificadoras dos oligonucleotídeos utilizados na detecção (TOX4 e TOX5) de *T. gondii*. (HOMAN et al., 2000)

Etapas	Número de ciclos	Período (minutos)	Temperatura (^{o}C)
Desnaturação	1	7	94
Desnaturação	34	1	94
Anelamento		1	60
Extensão		1	72
Extensão final	1	10	72

As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados. Foi preparado gel de agarose a 2% adicionado de 1,0µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Foram utilizados 8µL do material amplificado e como marcador de peso molecular 4 µL de 100pb ladder (Invitrogen). Para todas as amostras foram acrescidos 2 µL do tampão de corrida (0,25% azul de bromophenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal HE99 (GE-Healthcare) contendo TBE 1X (Life Technologies) e a voltagem empregada foi 100 V por 90 minutos utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE Healthcare). O gel foi visualizado em transiluminador UV e a imagem capturada pelo sistema GelDoc-It™ Imaging System foi fotodocumentada com auxílio do software Vision Works®LS.

4.16.1.4. *PCR quantitativo (qPCR)*

A quantificação da carga parasitária em cada tecido foi realizada utilizando-se o sistema SYBR Green, com a realização de curva padrão nas concentrações de 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 e 10^0 parasitos/mL por meio do

equipamento StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies, EUA). Para a pesquisa utilizou-se os *primers* oligonucleotídeos específicos para PCR em tempo real TOX529-F (5'CACAGAAGGGACAGAAGT'3) e TOX529-R (5'TCGCCTTCATCTACAGTC'3) (EDVINSSON et al., 2006), descritos na literatura para qPCR.

Para cada amostra foi utilizado 12,5 µL de Power SYBR® Green PCR master Mix (Life Technologies, EUA), 5 µM de cada oligonucleotídeo 8,5 µL de água ultrapura e 2 µL de amostra totalizando um volume final de 25 µL. As seguintes condições foram utilizadas: 95ºC por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 minuto e uma etapa para a curva de dissociação de 95°C por 15s, 60°C por 1 minuto e 95ºC por 15s.

O sinal de fluorescência foi adquirido nos passos de extensão do ciclo de amplificação. Todas as amostras foram processadas em duplicata. A quantidade de DNA presente nas amostras foi expressa em relação à curva-padrão que foi adicionada em cada ensaio. Os resultados foram visualizados e analisados em programa StepOne™ Software v2.1., conforme figura 10. O número de parasitos foi obtido por mL.

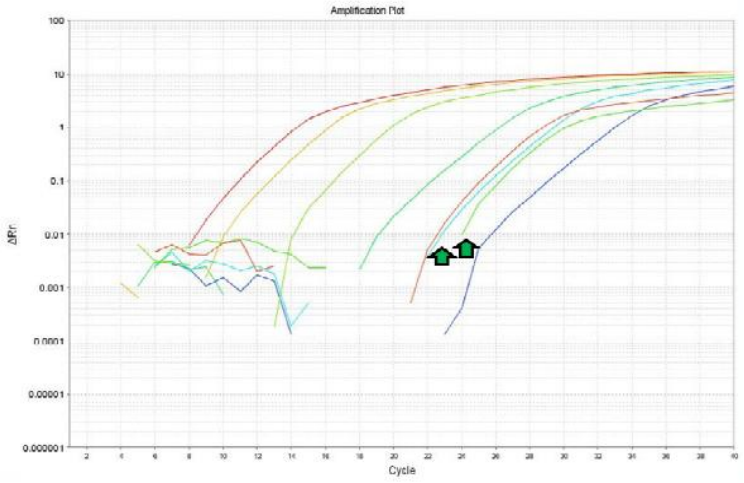


Figura 10. Intensidade de fluorescência emitida por duas amostras teciduais positivas (setas verdes) pela PCR quantitativa, de acordo com o ciclo de amplificação. As demais amostras são referentes à curva-padrão. Botucatu, SP, 2013.

4.16.2. Procedimentos sorológicos

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI):

As amostras de sangue foram colhidas semanalmente por punção intracardíaca e acondicionadas em tubos a vácuo sem anticoagulante para detecção de imunoglobulinas isotipos G, M e A para *T.gondii*.

Utilizou-se amostra de no mínimo 0,3 mL de soro para a pesquisa de anticorpos, acondicionado em microtubo identificado, e mantido a -20ºC.

No momento do exame, as amostras de soro foram diluídas em SST 0,01M pH7,2 nas diluições 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096, 1:16384, procedendo-se do mesmo modo para os soros controles positivo e negativo.

Na lâmina fixada previamente com o antígeno, distribuiu-se 10 µL de cada diluição do soro em cada poço, em fileira, ordenados em forma crescente de diluição, pipetando-se inversamente, ou seja, da maior diluição para a menor. Inclui-se o soro controle positivo e o negativo.

A lâmina foi incubada à 37^{o}C, em câmara úmida por 30 minutos (Etapa 3) e a seguir, realizaram-se duas lavagens em SST 0,01M pH7,2 por 10 minutos cada. Após, acrescentou-se à reação o conjugado, anticorpo específico anti-IgG/IgM/IgA conjugado com o isotiocianato de fluoresceína. Este conjugado foi diluído de acordo com o seu título previamente estabelecido, em solução de azul de Evans a 20 mg%, também previamente preparada.

O conjugado foi adicionado em cada uma das diluições, a lâmina foi então incubada à 37^{o}C, em câmara úmida por 30 minutos e a seguir lavada em SST 0,01M pH7,2 vezes durante 10 minutos cada, adotando-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após a secagem das lâminas, colocaram-se duas gotas de solução glicerinada pH 8,5 sobre a lâmina, cobrindo-se com lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência (Axio200® - Zeiss), com objetiva de 40X e ocular de 10X. Após a leitura dos controles, sem discordância com o resultado esperado, procedeu-se a leitura das amostras em teste, considerando-se como ponto final da reação a maior diluição do soro, em que ainda ocorreu fluorescência completa e intensa na borda de pelo menos 50% dos taquizoítos, sendo este então o título de anticorpos do animal (CAMARGO et al., 1974).

4.16.3. Contagem de cistos cerebrais

Os cérebros foram macerados individualmente em gral com pistilo, adicionado de 0,5mL de solução salina 0,85%, estéril, homogeneizado e submetido a contagem de cistos, pela adição de 25 μL da suspensão em lâmina de vidro, coberta com lamínula 22x22mm, para observação em microscópio óptico, objetiva 40x (Ax10® - Zeiss).

4.16.4. Leucograma

Contagem total:

A contagem foi realizada imediatamente após a colheita de sangue, sendo 20 μL de sangue depositados em tubos contendo 400 μL de solução diluente (líquido de Turk). O tubo era homogeneizado por inversão, e em seguida uma alíquota era depositada em câmara de Neubauer, com auxílio de tubo capilar realizando-se a contagem de leucócitos nos quatro quadrantes laterais da câmara. O resultado obtido foi multiplicado por 50, para conversão em células/μl (n.4 mm^2 x 20 x 10/4) (KANEKO et al., 1997).

Contagem diferencial:

A contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) foi realizada em extensões coradas com kit Panótico Rápido, contando-se 100 células, de acordo com as recomendações de Birgel (1992). Para confecção das lâminas, os esfregaços sanguíneos foram distendidos e após secagem prosseguiu-se com a coloração das lâminas. As lâminas foram estocadas em laminários, e a leitura foi realizada após o término das atividades práticas com os animais, por microscopia óptica (Ax10® - Zeiss)

4.16.5. Procedimento histopatológico

As amostras de intestino delgado foram processadas pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina - UNESP - Câmpus Botucatu.

As contagens de neutrófilos foram feitas em secções de 5 μm, coradas com hematoxilina-eosina (HE). Para detecção de macrófagos e linfócitos foi realizada a coloração por azul de toluidina. As células foram contadas em 30

campos aleatórios, desde a muscular até a superfície da mucosa. Os resultados da contagem das células foram expressos como a média do número de células/mm^2 de mucosa (CARDIA et al., 2011).

4.17. Análise estatística

Todos os dados referentes aos títulos de anticorpos, contagem de células, carga parasitária e número de neonatos foram tabulados em planilha Excel. Previamente as análises, foram verificadas a distribuição dos dados para posterior seleção do melhor teste estatístico. Para as análises de celularidade e pesquisa de anticorpos, em vários momentos dentro de um mesmo grupo, se os dados apresentaram uma distribuição normal, aplicou-se o teste paramétrico de Análise de Variância de um fator, ANOVA (F), seguido pelo teste de homogeneidade de variâncias (teste de Bartlett), e se as diferenças entre os desvios padrões não foram significativas, realizou-se a confirmação pelo teste de Tukey; porém se a distribuição dos dados não foi normal ou as diferenças entre os desvios-padrões foram significantes ao teste de Bartlett, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW).

Para efeito de análise, os títulos de anticorpos IgA, IgM e IgG, obtidos pela RIFI, foram transformados pela conversão em log (10*título) nos experimentos I e II. As curvas de anticorpos séricos foram então construídas a partir dos dados transformados, sendo demonstradas como média $\pm$ desvio-padrão dos títulos transformados em cada momento. As médias e desvios-padrões de cada grupo foram então analisados de acordo com a distribuição de seus dados, e os testes selecionados como descrito anteriormente (Ayres et al., 2007).

Em relação às análises a cada dois grupos (G1:G2; G3:G4; G5:G6; G7:G8) em um mesmo momento, seja para pesquisa de anticorpos ou de celularidade, foram analisadas quanto a distribuição de suas médias e desvios-padrões. Se os dados tiveram uma distribuição normal aplicou-se o teste t de Student (paramétrico), porém se a distribuição dos dados não foi normal aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (U), como foi o caso da análise realizada para a distribuição da carga parasitária a cada dois grupos

em ambos os experimentos. Por outro lado, as comparações realizadas entre mais de dois grupos foram realizadas pelo teste de KW.

Estatísticas associadas à performance dos resultados obtidos para ambos os experimentos pela qPCR foram calculadas tendo a PCR como padrão-ouro, utilizando-se a planilha descrita por Mackinnon (2000). Para todas as análises considerou-se um nível de significância (α) de 5% (Dohoo et al., 2010). Todas as análises foram realizadas nos programas GraphPad Prism v.5.01, GraphPad Instat v.3.06 e BioEstat v.5.0.

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO I

5.1.1. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) convencional

Na PCR convencional, em relação à detecção do DNA do *Toxoplasma* no tecido cerebral, foi possível verificar que não houve detecção do parasito nos grupos imunizados e submetidos aos desafios com bradizoítos (IDB) e taquizoítos (IDT). No grupo imunizado e desafiado com oocistos 50% das ratas apresentaram positividade. Quanto aos grupos desafiados pelas mesmas formas infectantes, porém não imunizados, encontrou-se 50%, 100% e 0% de positividade para bradizoítos (NIDB), oocistos (NIDO) e taquizoítos (NIDT), respectivamente. Nos desafios com bradizoítos e oocistos, os grupos imunizados apresentaram frequência relativa na positividade inferiores ($P<0,05$) aos grupos não imunizados, submetidos aos mesmos desafios (Tabela 1).

Não houve detecção do DNA do parasito nas amostras de tecido cardíaco nos grupos IDB e IDT, enquanto foi verificada 33,4% de positividade para o grupo de IDO. Os grupos não imunizados apresentaram positividade de 16,7%, 66,7% e 0% nos desafios com bradizoítos, oocistos e taquizoítos, respectivamente. Os grupos NIDB NIDO apresentaram frequência relativa na positividade estatisticamente superior ($P<0,0001$) aos grupos que receberam a imunização com a mesma forma infectante (Tabela 1).

Em todas amostras de baço e fígado não houve detecção do DNA parasitário. Enquanto nas amostras de pulmão apenas observou-se positividade em 16,7% das ratas do grupo NIDO (Tabela 1).

Em relação às amostras de tecido muscular, no grupo imunizado e desafiado com bradizoítos (IDB) observou-se positividade em membro anterior esquerdo (MAE), membro posterior esquerdo (MPE) e dorso esquerdo (DE) enquanto que todas foram negativas em membro anterior direito (MAD), membro posterior direito (MPD) e dorso direito (DD). No grupo submetido ao mesmo desafio, porém não imunizado encontrou-se positividade em todas as porções musculares com taxas de 50, 33,4 e 16,7%. As frequências na positividade foram estatisticamente significativas em : MAD, MPE, MPD, DE, DD ($P<0,0001$). Em todos os grupos musculares dos grupos desafiados com

oocistos encontrou-se positividade, porém a porcentagem foi menor no grupo imunizado (IDO) em relação ao grupo não imunizado (NIDO), o qual diferiu estatisticamente: MPE, MPD, DD (P<0,0001) (Tabela 1). No grupo imunizado e desafiado por taquizoítos 100% das amostras musculares foram negativas, enquanto que no grupo não imunizado encontrou-se positividade em amostra muscular de dorso direito, porém sem diferença estatística (Tabela 1).

A qPCR demonstrou que a carga parasitária do grupo imunizado e desafiado por bradizoítos (IDB), apresentou valores de mediana inferiores aos observados no grupo sem vacinação e submetidos ao mesmo desafio (NIDB) em amostras de cérebro, MAE, MPE, DE, com destaque para o tecido cerebral, onde esta diferença foi significativa (P<0,05) (Tabela 2; Figura 11-17).

Na inoculação com oocistos as medianas de carga parasitária encontrados no IDO, para amostra de cérebro, coração, fígado, MAD, MPE e DD, foi menor ao verificado NIDO, demonstrando diferença estatisticamente significativa no tecido cerebral, musculatura (MAD) e coração (P<0,05). Porém, em relação a porção muscular e DE, o grupo imunizado apresentou mediana significativamente superior ao não imunizado (Tabela 2; Figura 11-17).

Na inoculação por taquizoítos, não houve detecção quantitativa do DNA do parasito em amostras de baço e pulmão dos grupos imunizados e não imunizados. Nas demais amostras, a quantificação de parasitos foi menor no grupo imunizado, com significância estatística em amostras de tecido cerebral e porções musculares de MAD e DE (P<0,05) (Tabela 2; Figura 11-16). Em relação à distribuição de *T. gondii* nos tecidos, nos grupos desafiados com bradizoítos e oocistos houve maior estabelecimento do parasito em porções musculares e cérebro. Enquanto no desafio com taquizoítos esta distribuição foi maior em tecido muscular e cardíaco (Figura 17).

Analisando-se os grupos imunizados em relação aos não imunizados, mas submetidos ao mesmo desafio, independentemente do tecido analisado, verificou-se que no grupo imunizado e desafiado com bradizoítos houve redução significativa na carga parasitária (P<0,05). Nos grupos desafiados com oocistos e taquizoítos não foi verificada diferença estatística entre ratas imunizadas e não imunizadas, quando cada tecido não era avaliado individualmente (Tabela 3).

Verificou-se que os valores de mediana de carga parasitária encontrados nos neonatos de mães imunizadas, desafiadas por qualquer uma das formas infectantes, não diferiu estatisticamente dos neonatos de mães não imunizadas (Tabela 4). Porém, a porcentagem de neonatos infectados foi menor nos neonatos de ratas imunizadas, em todos os desafios. Os grupos imunizados apresentaram taxa de fecundidade de 66,66%, 83,33% e 66,6% no desafio por bradizoítos, oocistos e taquizoítos, respectivamente, enquanto que nos grupos não imunizados foi de 33,33%, em todos os desafios (Tabela 4). A média de neonatos/rata foi maior nos grupos imunizados, independente do desafio. A porcentagem na fecundidade entre grupos apenas imunizado e controle não diferiram (83,3%) e foram superiores aos grupos desafiados pelas diferentes formas infectantes do parasito (Tabela 4).

Tabela 1. Frequência relativa (%) de positivos à Reação em Cadeia pela Polimerase convencional para a detecção de *T. gondii* em amostras de tecidos, nos diferentes grupos analisados, experimento I. Botucatu, SP, 2013.

	GRUPOS								P
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
Cérebro	0A	50B	50B	100C	0A	0A	0A	0A	<0,0001
Coração	0A	16,7AB	33,4B	66,7C	0A	0A	0A	0A	<0,0001
Baço	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	1,0000
Pulmão	0A	0A	0A	16,7A	0A	0A	0A	0A	0,9277
Fígado	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	1,0000
MAE	16,7A	16,7A	66,7B	66,7B	0A	0A	0A	0A	<0,0001
MAD	0A	33,4B	83,4C	83,4C	0A	0A	0A	0A	<0,0001
MPE	16,7A	50B	66,7BC	83,4C	0A	0A	0A	0A	<0,0001
MPD	0A	33,4B	83,4C	100D	0A	0A	0A	0A	<0,0001
DE	16,7AB	33,4B	83,4C	83,4C	0A	0A	0A	0A	<0,0001
DD	0A	33,4AB	50B	83,4C	0A	16,7A	0A	0A	<0,0001

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste t de qui-quadrado.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Legenda:
MAE- Membro Anterior Esquerdo.
MAD- Membro Anterior Direito.
MPE- Membro Posterior Esquerdo.
MPD- Membro Posterior Direito.
DE- Dorso Esquerdo.
DD- Dorso Direito.

Tabela 2. Análise estatística, medianas e percentil de 25% e de 75% de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre os diferentes grupos analisados, segundo tecido analisado, experimento I. Botucatu, SP, 2013.

	GRUPOS								P
	IDB	NIDB	IDO	NIDO	IDT	NIDT	I	C	
Cérebro	0,0 [0,0-10,7]B	152,9 [0,0-532,5]AB	64,0 [0,0-496,0]AB	3212,3 [1683,0-6310,7]A	0,0 [0,0-0,0]B	0,0 [0,0-0,2]AB	0,0 [0,0-0,2]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,004
Coração	1,2 [0,0-10,4]AB	0,2 [0,0-73,4]AB	43,6 [0,5-161,0]AB	209,8 [69,8-248,8]A	0,4 [0,0-4,0]AB	0,7 [0,0-3,3]AB	1,1 [0,0-1,4]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,005
Baço	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,632
Pulmão	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-14,2]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,690
Fígado	0,5 [0,0-10,1]A	0,0 [0,0-0,2]A	0,7 [0,2-2,4]A	0,9 [0,1-2,7]A	0,1 [0,0-1,5]A	2,1 [0,7-12,4]A	0,1 [0,0-1,5]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,076
MAE	1,3 [0,0-18,5]AB	9,2 [0,1-19,9]AB	1096,0 [0,7-2060,2]A	112,3 [9,7-245,1]A	0,2 [0,0-2,1]AB	1,8 [0,5-3,9]AB	0,6 [0,0-2,5]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,006
MAD	7,5 [1,6-20,9]ABC	0,7 [0,0-751,0]ABC	291,6 [70,2-583,3]AB	1401,1 [1171,1-1864,8]A	0,8 [0,0-4,6]BC	4,1 [0,0-10,7]ABC	0,1 [0,0-1,4]BC	0,0 [0,0-0,0]C	<0,001
MPE	2,5 [0,0-69,5]AB	39,0 [0,1-204,5]AB	410,6 [24,0-547,5]A	1044,6 [531,0-1335,1]A	1,1 [0,6-2,1]AB	0,8 [0,0-3,4]AB	0,6 [0,0-1,1]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,001
MPD	2,9 [0,0-10,2]AB	1,3 [0,0-201,2]AB	783,4 [79,7-2502,9]A	449,8 [283,2-703,7]A	1,6 [0,2-3,1]AB	1,4 [0,0-2,9]AB	0,5 [0,1-1,4]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,002
DE	3,0 [0,0-4,8]ABC	65,5 [0,6-227,6]ABC	775,9 [95,2-2894,6]A	334,0 [224,0-723,2]AB	0,3 [0,0-1,3]BC	3,4 [0,1-10,1]ABC	1,7 [0,0-1,9]ABC	0,0 [0,0-0,0]C	<0,001
DD	2,2 [0,0-7,7]AB	1,1 [0,0-204,3]AB	65,9 [32,9-227,7]A	333,5 [60,8-1444,0]A	0,9 [0,0-1,5]AB	2,4 [0,0-5,4]AB	1,2 [0,0-1,7]AB	0,0 [0,0-0,0]B	<0,001

*Medianas seguidas pela mesma maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Teste Kruskal-Wallis.

Legenda:
IDB -Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Legenda:
MAE- Membro Anterior Esquerdo.
MAD- Membro Anterior Direito.
MPE- Membro Posterior Esquerdo.
MPD- Membro Posterior Direito.
DE- Dorso Esquerdo.
DD- Dorso Direito.

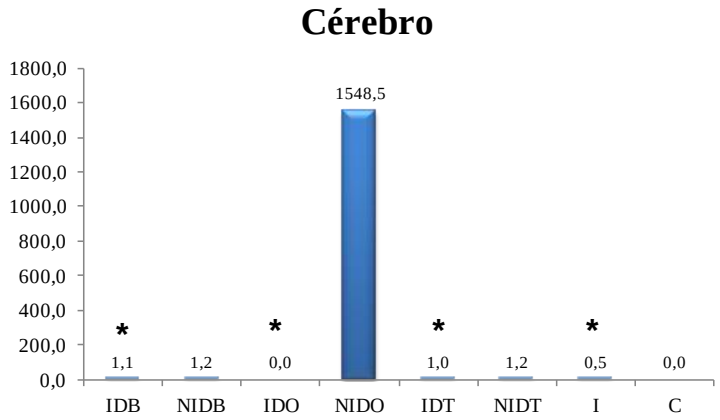


Figura 11. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido cerebral, nos oito grupos experimentais, **experimento I**. *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.Botucatu, SP, 2013.

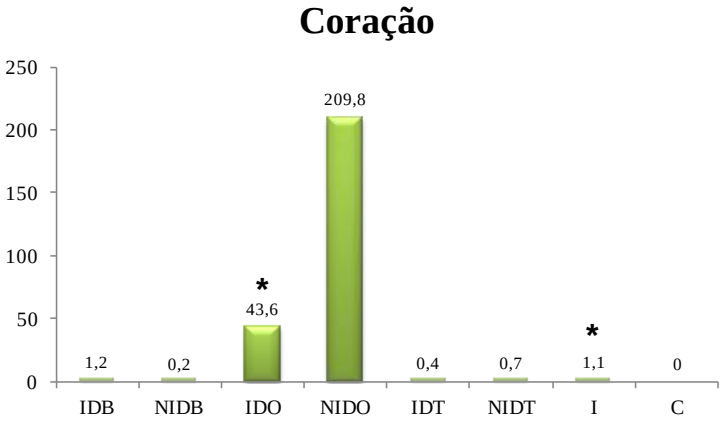


Figura 12. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de coração, nos oito grupos experimentais, **experimento I**. *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Botucatu, SP, 2013.

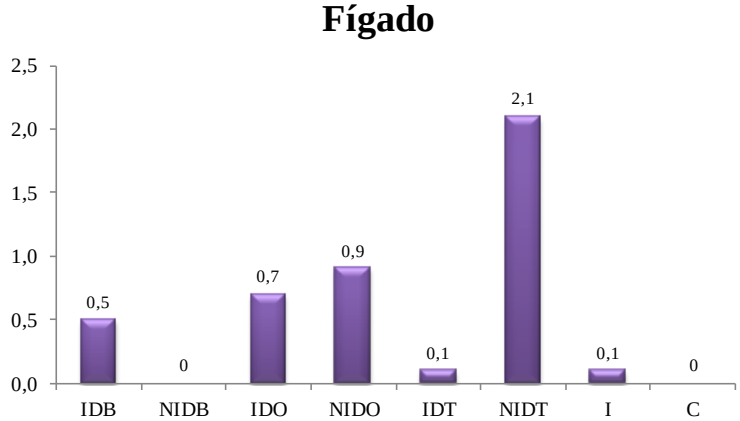


Figura 13. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido hepático, nos oito grupos experimentais, **experimento I**. *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.Botucatu, SP, 2013.

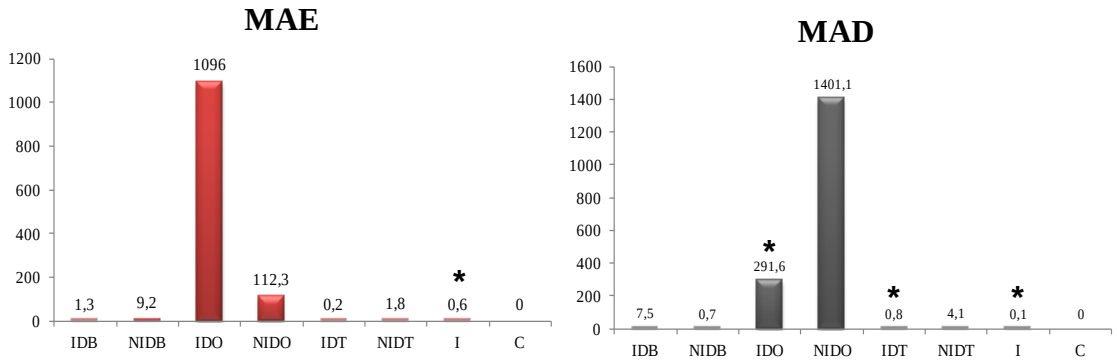


Figura 14. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro anterior esquerdo (MAE) e membro anterior direito (MAD), nos oito grupos experimentais, **experimento I.** *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.Botucatu, SP, 2013.

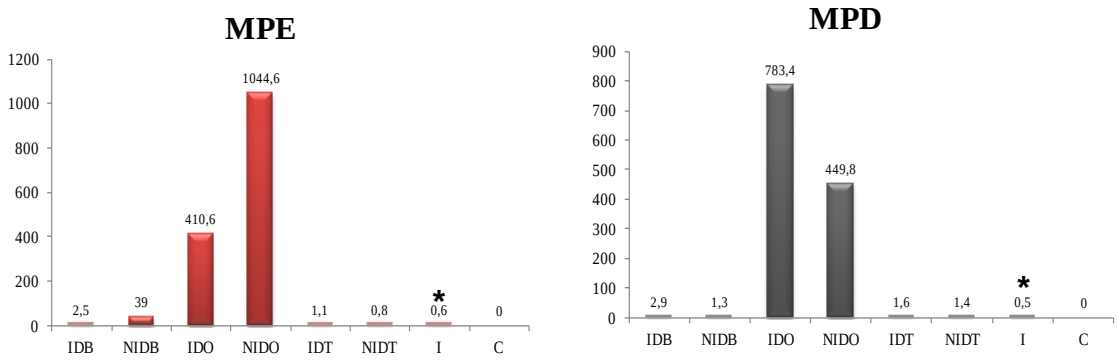


Figura 15. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro posterior esquerdo (MPE) e membro posterior direito (MPD), nos oito grupos experimentais, **experimento I.** *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.Botucatu, SP, 2013.

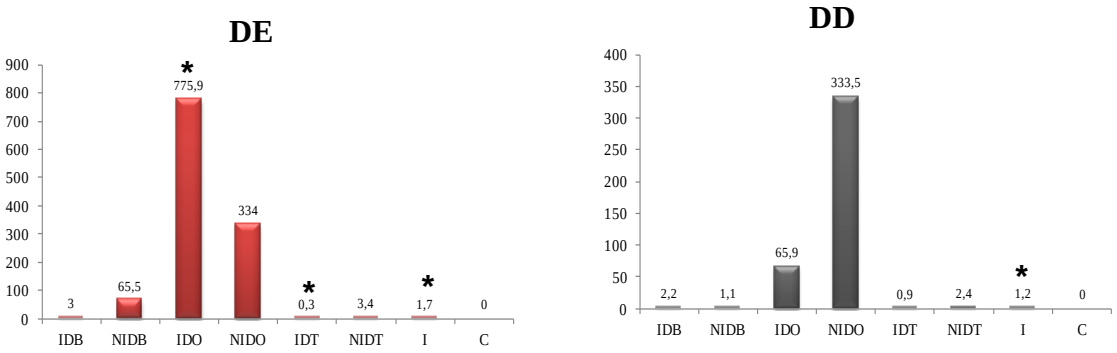


Figura 16. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de dorso esquerdo (DE) e dorso direito (DD), nos oito grupos experimentais, **experimento I.** *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.Botucatu, SP, 2013.

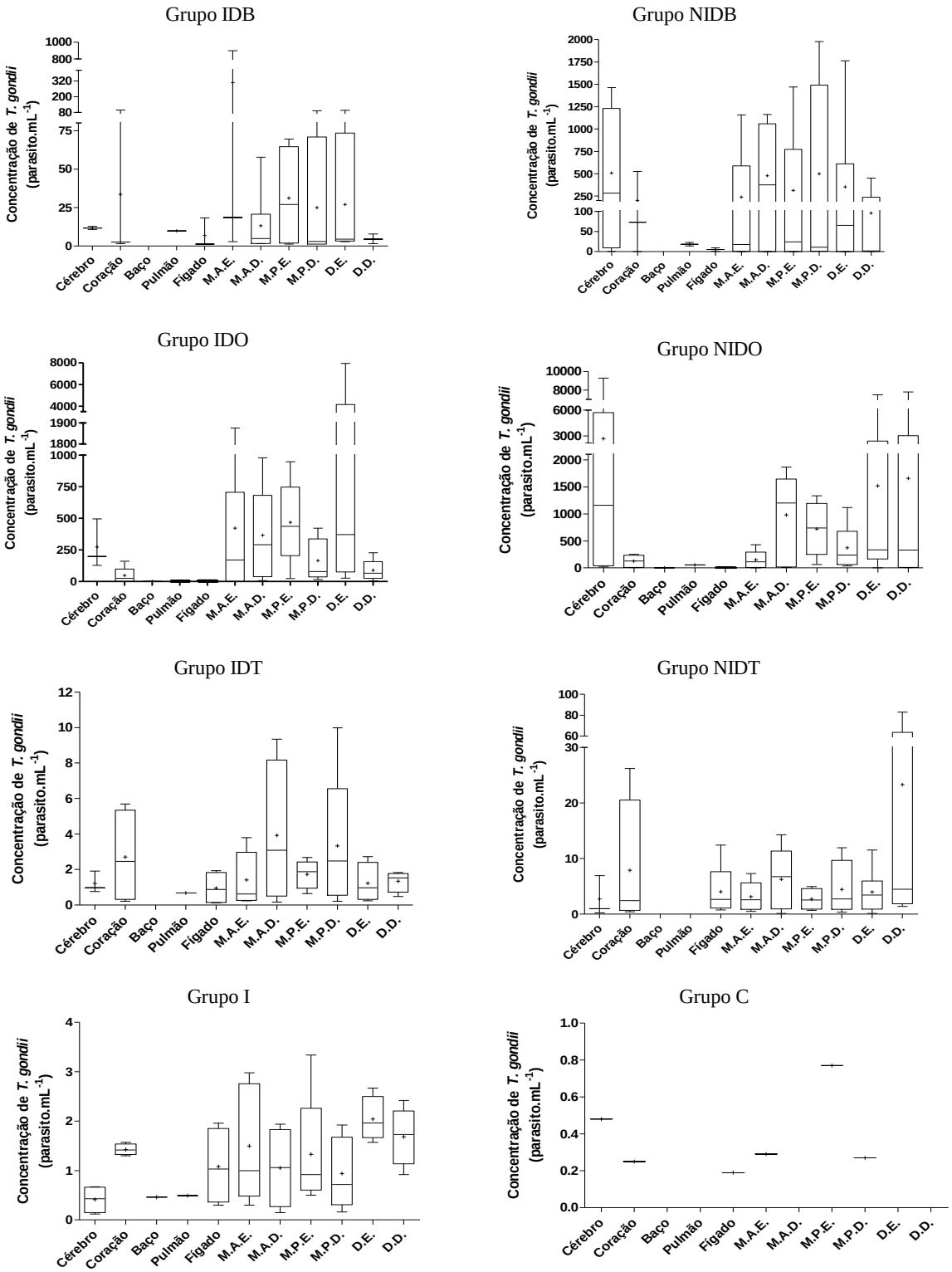


Figura 17. Mediana e variação interquartil (⊟), limites mínimo e máximo (⊢), e média (+) da carga parasitária entre os tecidos analisados para cada grupo do experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Tabela 3. Análise estatística, medianas e percentil de 25% (P25) e de 75% (P75) de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre grupos imunizados e não imunizados do experimento I, independentemente do tecido analisado, com base na forma infectante. Botucatu, SP, 2013.

Grupos	Mediana (parasito.mL^{-1})	P25-P75 (parasito.mL^{-1})	Min.-Max. (parasito.mL^{-1})	Estatística U*	Valor de *P*†
IDB	4,45^{A}	1,67 – 18,37	1,14 – 899,74	277,00	0,0028
NIDB	29,75^{B}	10,72 – 531,26	1,23 – 1978,50		
IDO	128,19^{A}	30,07 – 430,11	1,98 – 7931,40	934,00	0,2189
NIDO	245,11^{A}	41,66 – 1029,74	1,78 – 9292,80		
IDT	2,17^{A}	1,65 – 3,62	1,25 – 9,99	223,50	0,0709
NIDT	3,46^{A}	2,53 – 7,31	1,19 – 82,97		
I	1,73^{A}	1,43 – 1,98	1,00 – 3,34	0,00	0,0001
C	0,28^{B}	0,25 – 0,41	0,19 – 0,77		

Legenda: * Teste não paramétrico de Mann-Whitney (U); † Valor de *P* para um nível de significância de 5%.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 4. Perfil de fecundidade e infecção congênita em ratas dos grupos experimentais, com respectiva mediana de carga parasitária e percentil de 25% (P25) e de 75% (P75) para *T. gondii* nos neonatos do experimento I, comparando-se grupo imunizado com não imunizado, de acordo com a forma infectante inoculada. Botucatu, SP, 2013.

Grupo	Total de filhotes	Média	% fecundidade	Total de infectados	% infectados	Mediana de carga parasitária (parasitos.mL^{-1})	P25 – P75	Estatística U*	*P*†
IDB	42	7,00	66,60	35	83,33	3,83	1,33 – 7,69	346,50	0,6170
NIDB	18	3,00	33,30	16	88,89	3,89	2,22 – 6,29		
IDO	47	7,83	83,30	12	25,53	0,00	0,00 – 1,00	333,00	0,1873
NIDO	18	3,00	33,30	10	55,56	1,23	0,00 – 2,41		
IDT	46	7,67	66,60	23	50,00	0,78	0,00 – 2,11	236,50	0,7461
NIDT	15	2,00	33,30	8	53,33	1,71	0,50 – 1,81		
I	51	8,50	83,30	23	45,10	0,00	0,00 – 1,74	-	-
C	50	8,33	83,30	0	0,00	0,00	0,00 – 0,00		

Legenda: * Teste não paramétrico de Mann-Whitney (U); † Valor de *P* para um nível de significância de 5%.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

5.1.2. Sorologia

Verificou-se nos grupos imunizados (IDB, IDO, IDT, I) o início da produção de imunoglobulina IgM, sete dias após a imunização, na segunda colheita de sangue. Nos grupos não imunizados, detectou-se a presença de Ig M na oitava colheita, sete dias após o desafio. Nos animais previamente imunizados houve uma tendência de maior produção de anticorpos nos grupos desafiados com bradizoítos e oocistos (colheita 8) após o desafio em relação aos animais não imunizados, porém sem diferença estatística significativa (Tabela 5; Figura 18).

O mesmo perfil de produção de anticorpos foi verificado em relação a IgA, pois animais imunizados também apresentaram anticorpos sete dias após a imunização (colheita 2). Após desafio, os grupos previamente imunizados e desafiados com oocistos e taquizoítos apresentaram níveis de IgA estatisticamente superiores ao apresentado pelos grupos não imunizados, desafiados pelas mesmas formas infectantes do parasito. Porém, estatisticamente o mesmo não foi verificado nos grupos desafiados por bradizoítos (colheita 8), que diferiu estatisticamente do grupo não imunizado na colheita seguinte (colheita 9) (Tabela 6; Figura 18).

Nos grupos imunizados, a produção de IgG teve surgimento mais tardio, sendo evidenciada na terceira colheita de sangue, 14 dias após imunização. Nos grupos desafiados e não imunizados, esta produção iniciou-se na oitava colheita. Após o desafio, com as diferentes formas infectantes do parasito, o grupos imunizados desafiado com oocisto, apresentou uma maior média na produção de IgG com diferença significativa em relação aos grupos não imunizados (colheita 8). Na nona colheita, a produção de imunoglobulinas foi maior no grupo imunizado e desafiado com bradizoítos (IDB), em comparação com o respectivo grupo não imunizado, enquanto que nos grupos desafiados com taquizoítos e oocistos, a produção de anticorpos se igualou nas ratas imunizadas e não imunizadas (colheitas 9 e 10) (Tabela 7; Figura 18).

Tabela 5. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta para anticorpos da classe IgM (RIFI-IgM), nos diferentes grupos analisados, experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Colheita	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0A	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Aa	1,000
2	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,2 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Bc	1,0 ± 0,5A	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
3	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Cd	1,2 ± 0,0Bc	0,0 ± 0,0Cc	1,3 ± 0,7B	0,0 ± 0,0Cc	1,7 ± 0,2ABa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
4	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Cd	1,2 ± 0,0Bc	0,0 ± 0,0Cc	1,3 ± 0,7B	0,0 ± 0,0Cc	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
5	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Cd	1,2 ± 0,0Bc	0,0 ± 0,0Cc	1,3 ± 0,7B	0,0 ± 0,0Cc	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
6	1,3 ± 0,2ABb	0,0 ± 0,0Cd	1,2 ± 0,0Bc	0,0 ± 0,0Cc	1,3 ± 0,7B	0,0 ± 0,0Cc	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
7	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Cd	1,5 ± 0,4ABc	0,0 ± 0,0Cc	1,2 ± 0,6B	0,0 ± 0,0Cc	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
8	1,8 ± 0,0Aa	1,6 ± 0,1Ab	1,8 ± 0,3Aab	1,8 ± 0,0Aa	1,2 ± 0,6A	1,5 ± 0,3Aab	1,6 ± 0,3Aab	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
9	1,8 ± 0,0Aa	1,8 ± 0,0Aab	1,9 ± 0,2Aa	1,8 ± 0,0Aa	1,2 ± 0,6B	1,5 ± 0,3ABab	1,5 ± 0,3ABabc	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
10	1,8 ± 0,0ABa	1,9 ± 0,2Aa	1,9 ± 0,2Aa	1,8 ± 0,0ABa	1,2 ± 0,6C	1,6 ± 0,3ABCa	1,3 ± 0,2BCbc	0,0 ± 0,0Da	<0,001
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	

Estatística: *Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em log10 (x+1) – Análise de variância com medidas repetidas nas colheitas.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 6. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta para anticorpos da classe IgA (RIFI-IgA), nos diferentes grupos analisados, experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Colheita	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Aa	1,000
2	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
3	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
4	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
5	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
6	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
7	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,2 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
8	1,2 ± 0,0Ab	1,2 ± 0,0Ac	1,3 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,0 ± 0,5Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
9	1,8 ± 0,0Aa	1,5 ± 0,3ABb	1,6 ± 0,3ABa	1,5 ± 0,3ABa	1,2 ± 0,6Ba	1,3 ± 0,2ABb	1,2 ± 0,0Ba	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
10	1,8 ± 0,0Aa	1,8 ± 0,0Aa	1,8 ± 0,0Aa	1,6 ± 0,3ABa	1,2 ± 0,6Ba	1,6 ± 0,3ABc	1,2 ± 0,0Ba	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	

Estatística:*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em log10 (x+1) – Análise de variância com medidas repetidas nas colheitas.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 7. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T.gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG), nos diferentes grupos analisados, experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Colheita	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Aa	1,000
2	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Aa	1,000
3	1,5 ± 0,4Ac	0,0 ± 0,0Bc	1,5 ± 0,3Ac	0,0 ± 0,0Bd	1,4 ± 0,3Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,2 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
4	1,5 ± 0,4Ac	0,0 ± 0,0Bc	1,6 ± 0,3Ac	0,0 ± 0,0Bd	1,6 ± 0,4Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,3 ± 0,2Abc	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
5	1,5 ± 0,4Ac	0,0 ± 0,0Bc	1,9 ± 0,2Abc	0,0 ± 0,0Bd	1,6 ± 0,4Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,5 ± 0,3Aabc	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
6	1,5 ± 0,2Ac	0,0 ± 0,0Bc	1,9 ± 0,2Abc	0,0 ± 0,0Bd	1,6 ± 0,4Aa	0,0 ± 0,0Bc	1,8 ± 0,3Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
7	2,1 ± 0,5ABbc	0,0 ± 0,0Dc	2,3 ± 0,1Ab	0,0 ± 0,0Bd	1,5 ± 0,3Ca	0,0 ± 0,0Dc	1,7 ± 0,4BCab	0,0 ± 0,0Da	<0,001
8	2,0 ± 0,3BCbc	1,4 ± 0,3CDb	3,1 ± 0,2Aa	2,2 ± 0,7Bb	1,5 ± 0,3CDa	1,3 ± 0,2Db	1,7 ± 0,2BCDab	0,0 ± 0,0Ea	<0,001
9	3,0 ± 0,0Aa	2,4 ± 0,0Ba	3,1 ± 0,2Aa	3,0 ± 0,0Aa	1,7 ± 0,4Ca	1,7 ± 0,4Ca	1,7 ± 0,2Cab	0,0 ± 0,0Da	<0,001
10	2,5 ± 0,4Bab	2,6 ± 0,3ABa	3,2 ± 0,3Aa	3,2 ± 0,3Aa	1,7 ± 0,4Ca	1,7 ± 0,4Ca	1,5 ± 0,3Cabc	0,0 ± 0,0Da	<0,001
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	

Estatística:*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).
Dados transformados em log10 (x+1) – Análise de variância com medidas repetidas nas colheitas.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

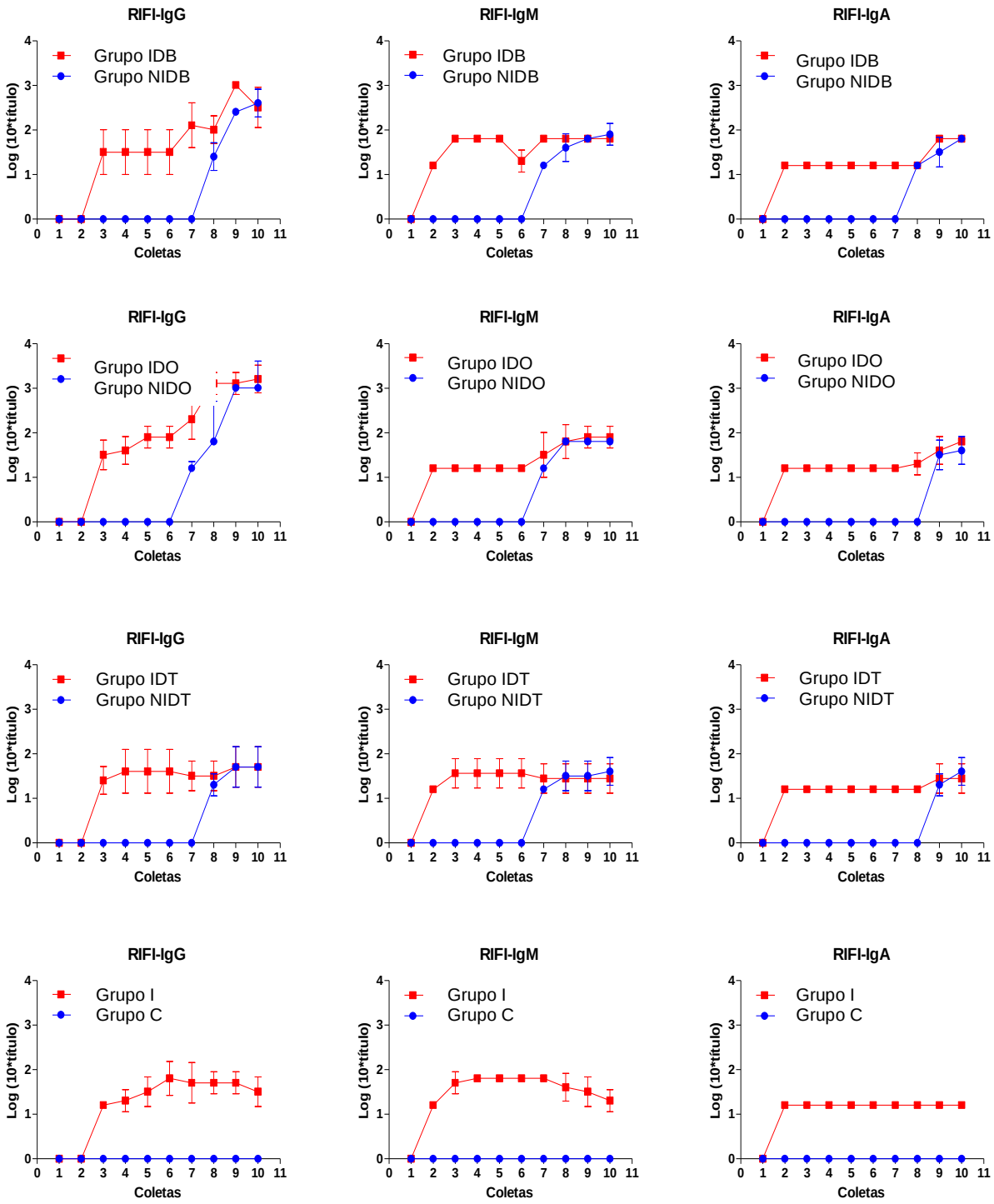


Figura 18. Variação entre média e desvio padrão das concentrações de anticorpos IgG, IgM e IgA de acordo com o grupo estudado do Experimento I. Botucatu, SP, 2013.

5.1.3. Contagem de cistos cerebrais

Nos animais imunizados não foram observados cistos cerebrais em 100% das ratas posteriormente desafiadas com bradizoítos (Figura 19). O mesmo desafio, no grupo não imunizado, levou a produção média de 10 cistos cerebrais por rata. Nos grupos submetidos a desafios com oocistos, houve formação cística do parasito nas ratas imunizadas e não imunizadas, porém a contagem média de cistos foi de 10 cistos/ratas no grupo imunizado contra 26,67 cistos/ratas no grupo não imunizado. Não foram observados cistos cerebrais nos grupos desafiados por taquizoítos (Figura 19).

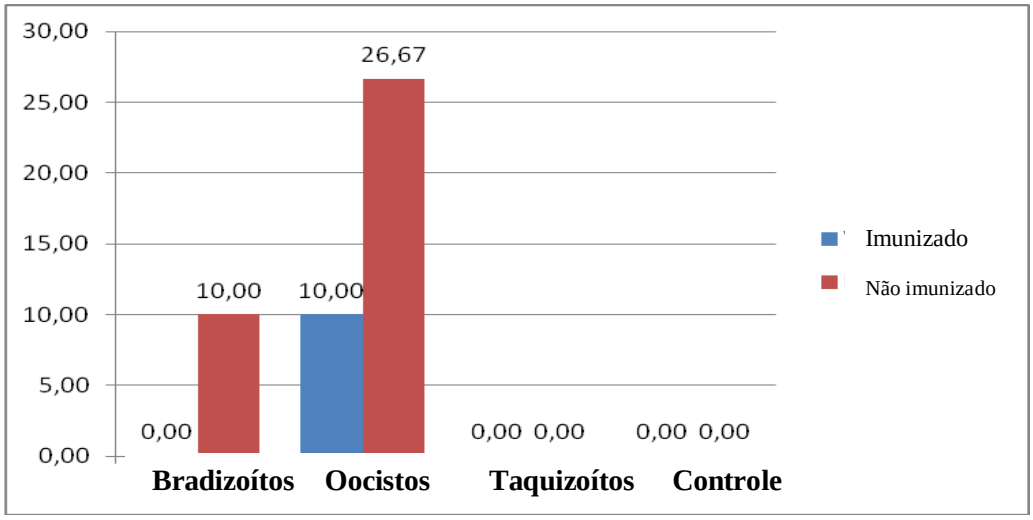


Figura 19. Média de cistos teciduais observados nos tecidos das ratas de acordo com o grupo estudado para o experimento I. Botucatu, SP, 2013.

5.1.4. Leucograma

Leucócitos:

Na contagem total de leucócitos verificou-se que, ao decorrer das colheitas, todos os grupos imunizados diferiram ($P<0,001$) (Tabela 8). Após sete dias da primeira dose da vacina (colheita 2) o grupo imunizados IDB apresentou aumento significativo no número total de leucócitos. Nos grupos não imunizados, observou-se queda no número dessas células, sem diferença estatística significativa em NIDB, NIDT ($P>0,05$). O mesmo aumento nos valores médios foi observado 14 dias após a última dose de vacina, porém sem diferença estatisticamente significativa (colheita 7) (Tabela 8). As colheitas 7, 8 e 9 corresponderam ao período gestacional das ratas, observando-se queda gradual no número de leucócitos em todos os grupos, com exceção do IDO, imunizados e desafiados com o parasito, mesmo após o desafio (colheita 8 representa sete dias após o desafio). O mesmo foi observado no grupo de ratas apenas imunizado (sem desafio). O grupo

controle (C) apresentou aumento celular numérico entre as colheitas sete e oito, porém não significativo, declinando posteriormente (colheitas 9 e 10), como nos demais grupos (Tabela 8).

Linfócitos:

Os grupos imunizados IDB e IDT apresentaram aumento no número de linfócitos sete dias após a imunização, enquanto que nos grupos não imunizados observou-se uma queda na sua contagem. Novamente, no período correspondente entre sete (colheita 7) e 14 dias de gestação (colheita 8) observou-se queda no número médio de linfócitos, (Tabela 9). Após a colheita 5, não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos imunizados e não imunizados.

Neutrófilos:

A contagem de neutrófilos após sete dias imunização apresentou o mesmo comportamento exibido na contagem das demais células, ou seja, inicialmente os grupos imunizados tiveram um aumento absoluto no número de neutrófilos. Na colheita sete, observou-se diferença significativa entre os grupos imunizados e não imunizados, submetidos ao desafio com oocistos, com número elevado na contagem de neutrófilos nas ratas imunizadas (Tabela 10).

Monócitos:

Verificou-se que houve alterações na sua contagem no decorrer das colheitas ($P<001$), com exceção do grupo controle. Na colheita sete, que corresponde ao sétimo dia de gestação houve um aumento considerável no número destas células nos grupos IDB, NIDB, IDO, NIDO, e I (Tabela 11). Nas demais colheitas, não foi possível verificar padrão homogêneo de resposta deste tipo celular entre os grupos. Após desafio, os monócitos foram as células que mais diferiram estatisticamente do grupo controle (colheitas 6, 7 e 8) (Tabela11).

Tabela 8. Valores médios de leucócitos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas e desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	4500,0 ± 1328,5Cc	6308,3 ± 929,2ABCa	6108,3 ± 1464,4ABCabc	7808,3 ± 1444,8Aab	5183,3 ± 1216,4BCabc	6900,0 ± 781,7ABa	6275,0 ± 1111,2ABCbc	7916,7 ± 1291,4Aa	<0,001
2	6100,0 ± 1006,0Aabc	6150,0 ± 1777,9Aa	5066,7 ± 1224,6Abcd	5475,0 ± 1033,3Abc	5900,0 ± 1740,7Aabc	6775,0 ± 1847,9Aa	7816,7 ± 1890,4Aab	6300,0 ± 1952,2Aa	0,157
3	5125,0 ± 1088,0BCbc	4808,3 ± 1129,3Ca	4466,7 ± 561,8Ccd	7375,0 ± 1599,6ABab	5008,3 ± 1405,1BCabc	7433,3 ± 1289,0ABa	7658,3 ± 1150,0Aab	687 ± 1937,4ABCa	<0,001
4	5383,3 ± 1489,5ABCabc	4891,7 ± 2214,8ABCa	3508,3 ± 706,7Cd	7083,3 ± 1349,7Aabc	4083,3 ± 1226,6BCc	5741,7 ± 512,3ABCa	5891,7 ± 682,2ABc	6091,7 ± 1017,5ABa	<0,001
5	5858,3 ± 1903,0Aabc	5850,0 ± 2020,6Aa	5516,6 ± 909,7Aabc	6433,3 ± 957,9Aabc	5116,6 ± 970,3Aabc	5825,0 ± 1085,2Aa	6308,3 ± 1691,5Aabc	5433,3 ± 978,0Aa	0,752
6	6525,0 ± 1414,8Aab	6150,0 ± 1596,5Aa	5875,0 ± 600,6Aabc	6200,0 ± 454,9Aabc	6033,3 ± 1197,7Aabc	5725,0 ± 1105,3Aa	6891,6 ± 723,4Aabc	5475,0 ± 948,0Aa	0,414
7	7241,6 ± 1138,1Aa	7083,3 ± 1726,7Aa	6991,6 ± 799,6Aa	8283,3 ± 1685,1Aa	7083,3 ± 930,4Aa	7283,3 ± 1303,3Aa	7633,3 ± 551,0Aab	6466,6 ± 991,8Aa	0,351
8	6275,0 ± 1384,4Aabc	6400,0 ± 2128,6Aa	6425,0 ± 776,3Aab	7716,6 ± 2000,1Aab	6766,6 ± 767,2Aab	7116,6 ± 1379,0Aa	8041,6 ± 564,2Aa	6800,0 ± 1216,5Aa	0,278
9	5650,0 ± 2906,0Aabc	6391,6 ± 1824,9Aa	7075,0 ± 1008,3Aa	6883,3 ± 1757,7Aabc	5700,0 ± 1234,9Aabc	6466,6 ± 1624,0Aa	7341,6 ± 974,3Aabc	6333,3 ± 1170,7Aa	0,598
10	4566,6 ± 2970,9Ac	5841,6 ± 1773,8Aa	6441,6 ± 1767,0Aab	5025,0 ± 1315,5Ac	4758,3 ± 1082,3Abc	6291,6 ± 1032,6Aa	6691,6 ± 406,7Aabc	6091,6 ± 1101,5Aa	0,172
P	<0,001	0,088	<0,001	<0,001	<0,001	0,060	<0,001	0,070	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Análise de variância com medidas repetidas nas colheitas.

Legenda:
IDB-Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 9. Valores médios de linfócitos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas e desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	3718,5 ± 1085,1Cb	5259,5 ± 805,9ABCa	5056,0 ± 1167,9ABCab	6537,3 ± 1315,5Aa	4148,8 ± 943,3BCab	5631,2 ± 725,0ABab	5060,1 ± 924,1ABCa	6234,9 ± 1100,8Aa	<0,001
2	4144,1 ± 866,4Aab	4665,0 ± 1337,3Aa	3772,3 ± 505,0Aabcd	4137,3 ± 663,3Acd	4619,8 ± 1029,9Aa	5120,5 ± 1614,8Aab	6105,1 ± 1649,4Aa	4899,0 ± 1570,8Aab	0,097
3	4248,0 ± 1237,8ABCab	3708,1 ± 979,1BCa	3387,3 ± 655,0Ccd	5956,1 ± 1488,3ABab	4051,1 ± 1226,9ABCab	6285,5 ± 1563,2Aa	6287,5 ± 944,5Aa	5223,3 ± 1421,1ABab	<0,001
4	4317,6 ± 1226,8ABab	3762,0 ± 677,8Ba	2802,7 ± 639,5Bd	5790,1 ± 1299,4Aabc	2955,8 ± 980,6Bb	4445,7 ± 667,7Ab	4715,1 ± 578,7ABa	4600,6 ± 717,7ABab	<0,001
5	4422,8 ± 1592,2Aab	3996,0 ± 1666,5Aa	3709,8 ± 577,0Abcd	4759,1 ± 745,4Abcd	3380,1 ± 839,7Aab	4664,1 ± 962,0Ab	4699,6 ± 1175,0Aa	4244,1 ± 819,2Aab	0,309
6	4804,5 ± 1160,5Aab	4337,1 ± 1152,3Aa	4128,3 ± 505,5Aabcd	4234,3 ± 282,7Acd	3869,3 ± 850,3Aab	4238,1 ± 731,3Ab	4870,1 ± 592,2Aa	4077,8 ± 886,2Ab	0,395
7	5555,5 ± 973,6Aa	5174,5 ± 1496,6Aa	4900,3 ± 797,3Aabcd	5956,1 ± 1198,5Aab	4830,6 ± 936,1Aa	5889,1 ± 1016,7Aab	5266,6 ± 824,8Aa	4744,8 ± 958,6Aab	0,320
8	4296,5 ± 1230,5Aab	4337,8 ± 1627,8Aa	3798,0 ± 663,6Aabcd	4852,1 ± 1087,4Aabcd	4007,0 ± 944,7Aab	4622,6 ± 1175,5Aab	5399,5 ± 919,3Aa	5094,3 ± 1265,4Aab	0,249
9	3641,8 ± 798,1Ab	4037,3 ± 1113,2Aa	5293,1 ± 479,6Aa	5459,1 ± 1428,2Aabcd	4189,3 ± 768,0Aab	4079,3 ± 877,4Ab	5158,3 ± 1046,8A	4095,6 ± 805,1Ab	0,053
10	3578,3 ± 2408,9Ab	4620,8 ± 1175,5Aa	4833,8 ± 1533,1Aabc	3831,3 ± 1137,5Ad	3491,5 ± 642,8Aab	4647,5 ± 890,2Aab	5079,6 ± 475,9Aa	5109,5 ± 922,3Aab	0,159
P	0,003	0,026	<0,001	<0,001	0,003	0,002	0,040	0,039	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Análise de variância com medidas repetidas nas colheitas**.**

Legenda:
IDB -Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 10. Valores médios de neutrófilos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	669,5 ± 172,3Ba	934,0 ± 186,5ABa	904,3 ± 325,7ABacd	968,2 ± 173,1ABa	802,3 ± 304,5ABa	951,2 ± 154,5ABab	980,0 ± 293,3ABa	1324,2 ± 545,3Aabc	0,039
2	1614,3 ± 822,1Aab	1035,6 ± 883,8Aa	969,0 ± 390,2Acd	1024,1 ± 384,4Aa	1013,0 ± 613,8Aac	1325,0 ± 496,4Aab	1288,5 ± 451,5Aa	993,0 ± 550,2Aabc	0,532
3	684,1 ± 252,1Aab	789,8 ± 331,8Aa	830,6 ± 215,4Aacd	762,3 ± 170,3Aa	702,1 ± 296,8Aa	872,6 ± 477,0Aab	1065,0 ± 283,6Aa	1224,6 ± 497,2Aabc	0,097
4	775,0 ± 371,7Aab	775,0 ± 401,2Aa	459,7 ± 169,0Aacd	923,0 ± 513,5Aa	739,0 ± 187,1Aa	951,4 ± 194,8Aab	820,1 ± 188,7Aa	1027,8 ± 253,9Aabc	0,097
5	1044,1 ± 303,5Aab	1450,5 ± 879,1Aa	1363,5 ± 696,8Aabc	1112,6 ± 319,9Aa	1459,1 ± 707,8Aabc	861,6 ± 219,9Aa	1041,0 ± 519,2Aa	839,1 ± 216,0Aac	0,281
6	1016,4 ± 205,2Aab	1336,3 ± 481,5Aa	1231,3 ± 499,4Aabcd	1609,1 ± 123,9Aa	1324,8 ± 458,1Aabc	1147,5 ± 299,5Aab	1465,8 ± 443,2Aa	1077,3 ± 195,3Aabc	0,119
7	1329,8 ± 313,6ABab	1627,6 ± 432,2Aba	2067,0 ± 548,0Abd	809,0 ± 502,3Ba	1866,0 ± 548,6Abc	1206,1 ± 385,6ABab	1599,1 ± 657,7ABa	1348,3 ± 293,7ABabc	0,002
8	1291,5 ± 540,7Aab	1474,1 ± 727,8Aa	1784,8 ± 479,9Abcd	1699,5 ± 465,2Aa	2142,1 ± 567,6Abc	1780,6 ± 930,1Ab	1706,5 ± 1005,8Aa	1255,3 ± 402,2Aabc	0,538
9	1680,6 ± 1089,5Aab	1810,0 ± 999,3Aa	1187,3 ± 512,9Aac	1079,1 ± 420,6Aa	1080,5 ± 872,5Aac	1784,8 ± 752,3Ab	1629,8 ± 659,2Aa	1719,6 ± 375,7Ab	0,383
10	664,1 ± 330,8Ba	1018,1 ± 511,9ABa	1199,0 ± 418,5ABac	895,0 ± 377,9ABa	930,1 ± 373,3ABac	1216,8 ± 220,9ABab	1347,6 ± 374,3Aa	676,8 ± 271,5ABac	0,019
P	0,001	0,210	<0,001	0,022	<0,001	0,008	0,011	0,002	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Análise de variância com medidas repetidas nas colheitas.

Legenda:
IDB – Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas .
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 11. Valores médios de monócitos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	111,9 ± 106,5Cc	114,6 ± 68,5Cd	148,0 ± 127,7BCd	302,7 ± 33,3ABb	232,1 ± 98,8ABCb	317,5 ± 54,0Abc	234,7 ± 106,0ABCc	357,5 ± 79,9Aa	<0,001
2	341,5 ± 88,7Ac	449,3 ± 223,9Aabc	325,3 ± 92,8Acd	313,5 ± 85,4Ab	267,1 ± 144,9Ab	329,5 ± 196,3Abc	423,0 ± 122,4Abc	408,0 ± 305,4Aa	0,609
3	192,7 ± 88,3Bc	310,3 ± 94,9Bbcd	248,6 ± 144,5Bd	656,5 ± 235,8Ab	255,0 ± 114,6Bb	275,1 ± 137,8Bbc	305,8 ± 168,4Bbc	418,6 ± 183,5ABa	<0,001
4	290,5 ± 90,9Ac	354,6 ± 314,3Abcd	245,8 ± 116,1Ad	370,1 ± 134,3Ab	276,0 ± 169,8Ab	344,5 ± 183,0Abc	356,3 ± 140,2Abc	463,1 ± 354,3Aa	0,726
5	391,3 ± 196,5Abc	403,5 ± 130,1Aabcd	443,3 ± 186,5Acd	561,5 ± 249,7Ab	277,3 ± 151,0Ab	299,1 ± 158,8Abc	451,8 ± 347,7Aabc	365,8 ± 141,7Aa	0,355
6	669,0 ± 354,6ABab	376,5 ± 124,1ABbcd	426,1 ± 117,6ABcd	356,5 ± 144,0Bb	839,1 ± 519,5Aa	339,3 ± 181,9Bbc	438,1 ± 214,3ABbc	319,8 ± 123,6Ba	0,011
7	909,6 ± 332,6ABCa	701,3 ± 211,3BCDa	1029,3 ± 233,4ABa	1254,8 ± 220,6Aa	386,6 ± 191,8DEb	188,0 ± 56,2Ec	634,1 ± 113,2CDab	373,5 ± 174,8DEa	<0,001
8	687,0 ± 326,1ABab	404,6 ± 260,1Babc	842,1 ± 206,6ABab	1165,0 ± 441,5Aa	617,5 ± 236,4Bab	713,3 ± 320,6ABa	801,5 ± 193,1ABa	450,3 ± 296,9Ba	0,002
9	327,5 ± 124,1Ac	557,8 ± 240,5Aab	594,5 ± 284,3Abc	345,0 ± 142,3Ab	430,1 ± 97,6Aab	602,5 ± 166,8Aab	553,5 ± 233,4Aabc	518,0 ± 173,2Aa	0,088
10	324,1 ± 254,4Ac	202,6 ± 176,5Acd	408,8 ± 54,7Acd	298,6 ± 140,5Ab	268,3 ± 202,3Ab	427,3 ± 182,6Aabc	264,3 ± 165,1Abc	305,3 ± 201,4Aa	0,426
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,534	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Análise de variância com medidas repetidas nas colheitas.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

5.1.5. Histopatologia

No histopatológico avaliou-se a resposta inflamatória no intestino delgado após a eutanásia das ratas pela contagem de neutrófilos, linfócitos e macrófagos. Verificou-se que a contagem média local de linfócitos foi maior em todos os grupos submetidos a imunização, com diferença significativa entre IDB e NIDB e entre I e C (P<0,05). Nos grupos desafiados com taquizoítos (IDT e NIDT) e oocistos (IDO e NIDO), embora haja diferença numérica, com número maior de células nos grupos imunizados, não diferiram significativamente (Tabela 12; Figura 20).

Em relação aos neutrófilos, observou-se numericamente que os grupos imunizados apresentaram maior contagem de células em relação aos não imunizados, com diferença estatística observada somente no desafio com bradizoítos (Tabela 12; Figura 20). Quanto à contagem de macrófagos não foi evidenciada diferença estatística entre os grupos, nos diferentes desafios (P>0,05).

Evidenciou-se que a contagem de linfócitos foi maior em todos os grupos experimentais do que os outros dois tipos celulares estudados (neutrófilos e macrófagos), seguidos pelos neutrófilos e macrófagos, respectivamente.

Tabela 12. Comparação entre as médias da contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos e macrófagos por mm^2 da mucosa de intestino delgado das ratas submetidas a diferentes protocolos de imunização e exposição, no experimento I. Botucatu, SP, 2013.

Grupos	Neutrófilos	Linfócitos	Macrófagos	Estatística	Valor de $P^{\ddagger}$
Grupo IDB	$126,54 \pm 31,90^{Aab}$	$737,66 \pm 228,21^{Aa}$	$18,52 \pm 20,29^{Ab}$	KW = 15,316*	0,0005
Grupo NIDB	$77,16 \pm 21,65^{Bab}$	$415,12 \pm 73,01^{Ba}$	$18,52 \pm 16,57^{Ab}$	KW = 15,237*	0,0005
Estatística	t = 3,138; P = 0,0105	t = 3,297; P = 0,0081	t = 0,000; P > 0,9999	-	-
Grupo IDO	$104,94 \pm 51,94^{Aab}$	$737,65 \pm 162,47^{Aa}$	$12,35 \pm 9,56^{Ab}$	KW = 15,348	0,0005
Grupo NIDO	$67,902 \pm 25,30^{Aab}$	$564,82 \pm 126,01^{Aa}$	$12,35 \pm 9,56^{Ab}$	KW = 15,364	0,0005
Estatística	t = 1,570; P = 0,1474	U = 6,00; P = 0,0649	U = 18,00; P = 0,9340	-	-
Grupo IDT	$141,97 \pm 51,94^{Aab}$	$597,17 \pm 150,48^{Aa}$	$18,52 \pm 11,73^{Ab}$	KW = 15,348	0,0005
Grupo NIDT	$108,02 \pm 39,58^{Aab}$	$494,92 \pm 88,94^{Aa}$	$18,52 \pm 11,73^{Ab}$	KW = 15,380	0,0005
Estatística	t = 1,274; P = 0,2316	t = 1,405; P = 0,1903	U = 18,00; P = 0,9342	-	-
Grupo I	$98,76 \pm 27,88^{Aab}$	$904,32 \pm 119,25^{Aa}$	$24,69 \pm 19,13^{Ab}$	KW = 15,252*	0,0005
Grupo C	$61,73 \pm 30,24^{Aab}$	$569,45 \pm 115,16^{Ba}$	$12,35 \pm 9,56^{Ab}$	KW = 14,696	0,0006
Estatística	t = 2,206; P = 0,0520	t = 4,948; P = 0,0006	U = 11,00; P = 0,2865	-	-

Legenda: KW: Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; U: Teste não paramétrico de Mann-Whitney; t: teste t de Student não pareado; * Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis adotado devido aos dados apresentarem distribuição normal porém os desvios padrões apresentaram diferença significativa ao teste de homogeneidade de variância (Teste de Bartlett); ‡ Valor de P para um nível de significância de 5%.

Estatística: valores de P menores que 0,05 indicam diferenças significativas entre as contagens de células específicas no momento estudado ou entre os grupos – valores de médias seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre as contagens. Letras maiúsculas avaliam na vertical as diferenças entre os grupos para cada tipo específico de célula (teste t de Student não pareado ou teste não paramétrico de Mann-Whitney). Letras minúsculas avaliam na horizontal as diferenças entre as células específicas para um mesmo grupo (Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

Legenda:

IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

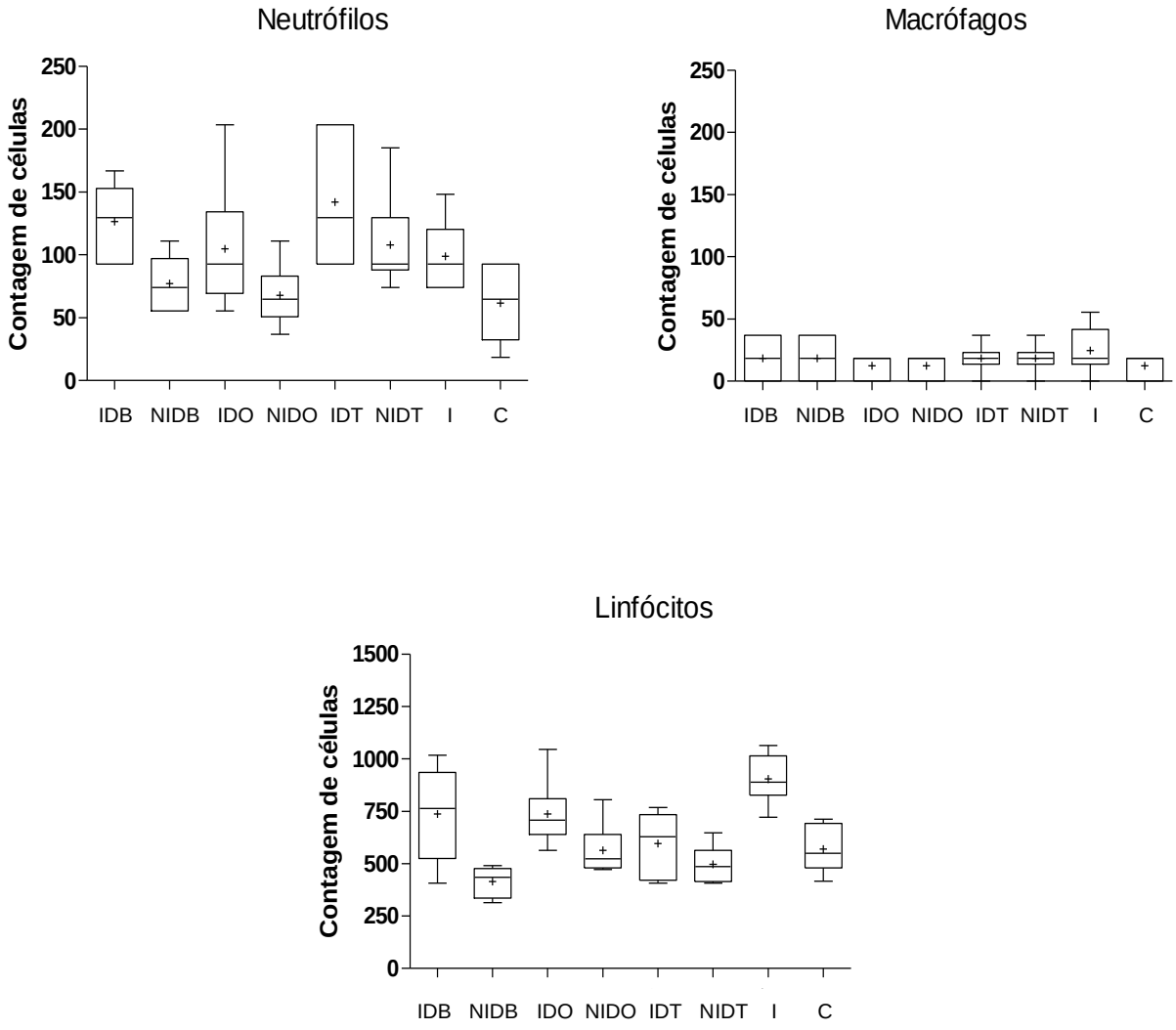


Figura 20. Mediana e variação interquartil (⊟), limites mínimo e máximo (⊢), e média (+) da contagem de células do sistema imune no intestino delgado dos animais do experimento I, de acordo com os grupos estudados. Botucatu, SP, 2013.

5.2. EXPERIMENTO II

5.2.1. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A PCR convencional demonstrou que em resposta ao desafio por bradizoítos, não houve positividade no grupo de animais imunizados (IDB), em todos os órgãos analisados, enquanto que no grupo submetido ao desafio sem vacinação encontrou-se 20% e 40% de positividade em porções musculares de membro posterior direito e dorso esquerdo, respectivamente, com diferença estatística significativa apenas em dorso esquerdo (Tabela 13). A PCR foi sensível em detectar positividade em amostras que houvesse DNA acima do limite mínimo de detecção, 100 parasito.mL^{-1}.

Para o grupo IDT obteve-se 100% de negatividade, em todos os tecidos analisados. No grupo desafiado sem vacinação (NIDT) observou-se 20% de ratas positivas em amostras musculares de membro posterior direito e 20% em dorso direito, porém não diferiram estatisticamente do grupo não imunizado. Os grupos somente imunizados e controle foram negativos à PCR convencional (Tabela 13).

Para os grupos desafiados com oocistos, em 20% das ratas imunizadas encontrou-se positividade nas amostras de cérebro, coração, membro anterior direito, membro posterior esquerdo, membro posterior direito e dorso esquerdo. No grupo não imunizado, a porcentagem de animais positivos foram maiores para cérebro (60%), membro anterior esquerdo (20%), membro anterior direito (40%), membro posterior esquerdo (40%) membro posterior direito (80%), dorso esquerdo (60%) e dorso direito (80%). Para amostra de tecido cardíaco, a porcentagem de positivo (20%) foi igual para o grupo imunizado (Tabela 13). Cérebro, MPD, DE e DD apresentaram diferença significativa entre imunizados e não imunizados.

Na qPCR o grupo IDB apresentou numericamente carga parasitária menor em todos os tecidos analisados em comparação com as ratas não imunizadas, sem diferença significativa (Tabela 14; Figuras 21-27). Amostras negativas a PCR convencional, foram positivas a qPCR em quantidades inferiores a 100 parasito.mL^{-1}.

Em relação às formas infectantes, as maiores cargas parasitárias foram encontradas nos grupos de ratas desafiadas por oocistos, onde as ratas IDO apresentaram valores estatisticamente menores para tecido cerebral e muscular, nas porções de membro anterior esquerdo e direito, membro posterior direito e dorso esquerdo e direito (Tabela 14; Figuras 21-27), com destaque para a alta carga parasitária do tecido cerebral do grupo NIDO com mediana de 1548,5 parasito.mL^{-1}.

No desafio com taquizoítos, a carga parasitária foi menor no grupo IDT, porém sem diferença estatística entre imunizados e não imunizados (P>0,05), à exceção da porção

muscular de dorso esquerdo em que, contrariamente, o grupo imunizado apresentou valor de mediana estatisticamente superior ao não imunizado (Tabela 14; Figuras 21-27). Analisando-se os grupos imunizados em relação aos não imunizados, mas submetidos ao desafio com a mesma forma infectante, independentemente do tecido analisado, verificou-se que no grupo imunizado e desafiado com bradizoítos houve redução altamente significativa na carga parasitária (P<0.0001). Nos grupos desafiados com oocistos e bradizoítos não foi verificada diferença estatística entre ratas imunizadas e não imunizadas (P>0,05) (Tabela 15). Semelhante ao verificado no experimento I, o parasito se distribuiu mais frequentemente em musculatura, cérebro e coração (Figura 27).

Verificou-se que os valores de mediana de carga parasitária encontrado nos filhotes de mães imunizadas e desafiadas com bradizoítos, oocistos e taquizoítos foram menores aos encontrados nos neonatos em que as mães não receberam a vacina (Tabela 16). A taxa de fecundidade foi de 60% para a maioria dos grupos analisados, com exceção de NIDO (80%) ou seja, três fêmeas por grupo pariram, independente da imunização. O número de filhotes por rata não diferiu entre IDT e NIDT e entre I e C, porém foi ligeiramente inferior nos grupos IDB e IDO em relação aos não imunizados. A porcentagem de animais lactantes infectados foi maior em todos os grupos não imunizados, independentemente do desafio, com exceção dos grupos controle (Tabela 16).

Realizaram-se cinco colheitas de leite, duas colheitas na primeira (dia 2 e 6 da lactação) e segunda semana de lactação (dia 10 e 14 da lactação) e uma única colheita na terceira semana de lactação (dia 18 da lactação). O encontro do agente no leite foi verificado em todos os grupos, imunizados ou não, expostos a diferentes formas infectantes do parasito. Quanto à quantificação do parasito no leite, não houve diferença estatística significativa entre os grupos imunizados e não imunizados. Os maiores valores de mediana encontrados foram verificados nos grupos desafiados por taquizoítos, na última colheita (P>0,05) (Tabela 17; Figura 28).

Tabela 13. Frequência relativa (%) de positivos à Reação em Cadeia pela Polimerase convencional para a detecção de *T. gondii* em amostras de órgãos, nos diferentes grupos analisados, experimento II. Botucatu, SP, 2013.

	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
Cérebro	0A	0A	20A	60B	0A	0A	0A	0A	<0,0001
Coração	0A	0A	20A	20A	0A	0A	0A	0A	0,5034
Baço	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	1,000
Pulmão	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	1,000
Fígado	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	1,000
MAE	0A	0A	0A	20A	0A	0A	0A	0A	0,8256
MAD	0A	0A	20AB	40B	0A	0A	0A	0A	0,0190
MPE	0A	0A	20AB	40B	0A	0A	0A	0A	0,0190
MPD	0A	20[a]	20A	80B	0A	20A	0A	0A	<0,0001
DE	0A	40BC	20AB	60C	0A	0A	0A	0A	<0,0001
DD	0A	0A	0A	80B	0A	20A	0A	0A	<0,0001

Estatística: valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste t de qui-quadrado.

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com cistos.
NIDB- Ratas não imunizadas desafiadas com cistos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle, Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Legenda:
MAE- Membro Anterior Esquerdo.
MAD- Membro Anterior Direito.
MPE- Membro Posterior Esquerdo.
MPD- Membro Posterior Direito.
DE- Dorso Esquerdo.
DD- Dorso Direito.

Tabela 14. Análise estatística medianas e percentil de 25% e de 75% de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre os diferentes grupos analisados, segundo tecido analisado, experimento II. Botucatu, SP, 2013.

	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
Cérebro	1,1 [0,6-2,9]A	1,2 [0,1-6,5]A	0,0 [0,0-2620,2]A	1548,5 [0,7-4257,0]A	1,0 [0,0-2,2]A	1,2 [0,1-4,4]A	0,5 [0,2-1,5]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,066
Coração	4,3 [2,6-9,8]AB	5,6 [0,0-12,4]AB	12,5 [3,2-659,0]A	9,1 [8,5-164,7]A	0,0 [0,0-2,3]AB	3,5 [1,9-11,8]AB	1,4 [0,3-4,0]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,003
Baço	0,0 [0,0-0,6]A	0,7 [0,0-1,4]A	0,2 [0,0-4,4]A	0,0 [0,0-3,3]A	0,0 [0,0-0,8]A	0,0 [0,0-1,2]A	0,5 [0,0-4,2]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,330
Pulmão	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,2 [0,0-1,3]A	0,0 [0,0-0,3]A	0,0 [0,0-0,2]A	0,0 [0,0-1,1]A	0,0 [0,0-0,0]A	0,199
Fígado	1,5 [0,0-2,3]AB	6,7 [2,2-12,4]A	3,5 [2,1-4,8]AB	1,5 [0,1-17,5]AB	1,0 [0,6-2,0]AB	3,7 [0,9-7,1]AB	3,7 [2,6-5,2]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,015
MAE	2,1 [1,5-3,4]AB	6,2 [1,5-7,5]AB	4,6 [3,2-9,0]AB	11,6 [10,5-1406,6]A	1,0 [0,5-3,8]AB	1,5 [0,4-2,2]B	5,5 [1,7-6,1]AB	0,0 [0,0-0,0]B	<0,001
MAD	1,8 [0,6-2,8]AB	16,2 [5,1-24,6]A	3,5 [1,8-3884,8]AB	10,8 [5,4-577,2]A	3,8 [1,6-5,3]AB	2,3 [1,3-4,2]AB	3,9 [0,2-7,4]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,009
MPE	2,2 [03-2,3]AB	14,0 [9,6-32,7]A	3,1 [2,5-7647,4]A	18,7 [9,5-1100,5]A	2,7 [1,8-5,1]AB	2,7 [0,4-3,4]AB	6,8 [4,8-8,8]AB	0,0 [0,0-0,0]B	<0,001
MPD	1,5 [1,4-3,9]AB	25,7 [14,9-56,8]A	1,1 [1,1-18225,3]AB	1408,1 [321,6-2793,6]A	2,4 [1,3-3,0]AB	1,1 [0,0-28,3]AB	3,9 [3,4-6,0]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,002
DE	3,3 [2,3-4,1]AB	9,2 [3,1-324,7]A	2,7 [1,0-2477,9]AB	1912,8 [3,5-3065,0]A	7,8 [3,6-8,8]A	3,9 [1,4-5,4]AB	5,6 [4,4-6,6]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,011
DD	3,2 [1,1-7,4]AB	7,3 [0,8-12,6]AB	1,0 [0,2-4,1]AB	968,8 [679,6-2707,6]A	10,2 [3,0-11,2]AB	2,6 [1,6-31,9]AB	4,7 [4,4-6,5]AB	0,0 [0,0-0,0]B	0,003

*Medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com cistos.
NIDB- Ratas não imunizadas desafiadas com cistos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle, Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Legenda:
MAE- Membro Anterior Esquerdo.
MAD- Membro Anterior Direito.
MPE- Membro Posterior Esquerdo.
MPD- Membro Posterior Direito.
DE- Dorso Esquerdo.
DD- Dorso Direito.

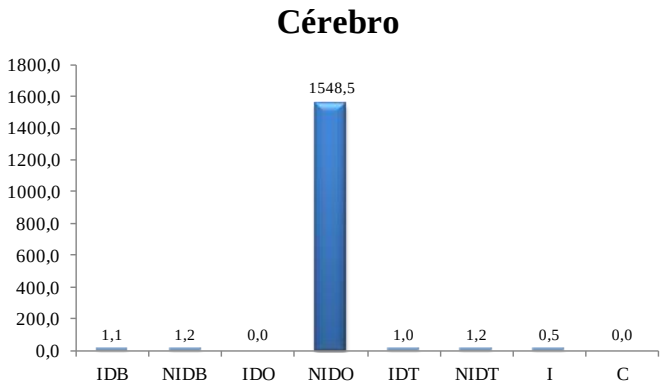


Figura 21. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido cerebral, nos oito grupos experimentais, **experimento II**. *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Botucatu, SP, 2013.

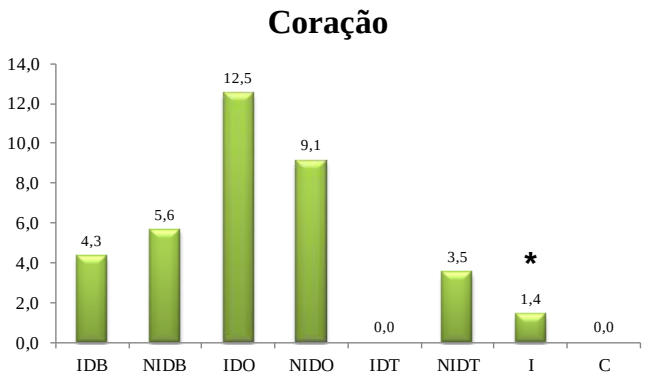


Figura 22. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido cardíaco, nos oito grupos experimentais, **experimento II**. *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Botucatu, SP, 2013.

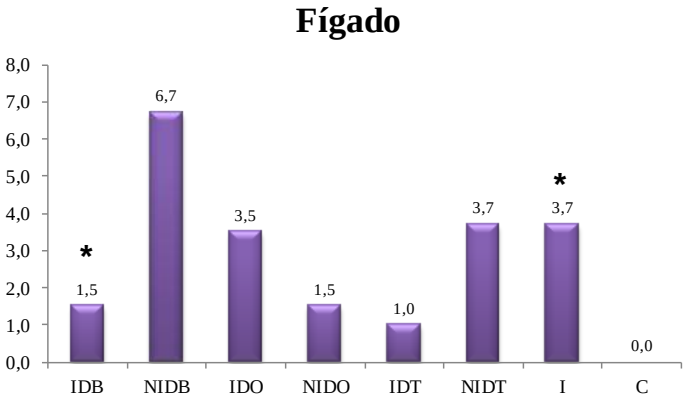


Figura 23. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido hepático, nos oito grupos experimentais, **experimento II**. *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Botucatu, SP, 2013.

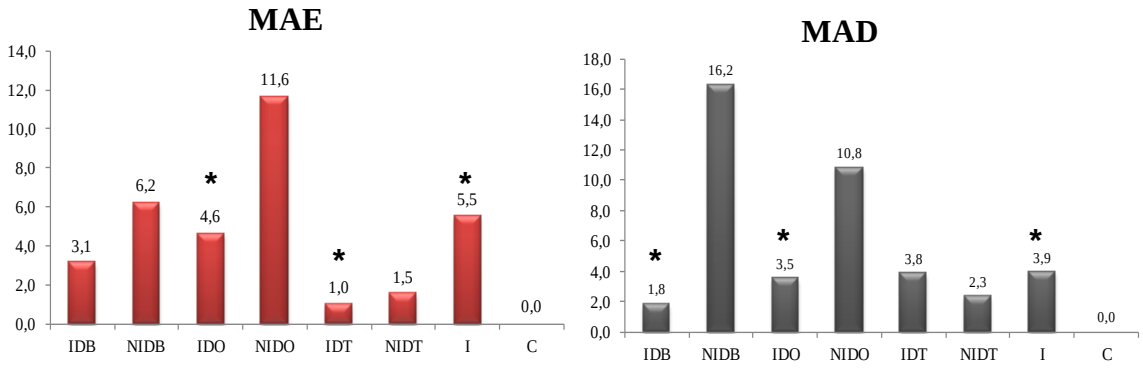


Figura 24. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro anterior esquerdo (MAE) e membro anterior direito (MAD), nos oito grupos experimentais, **experimento II.** *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Botucatu, SP, 2013.

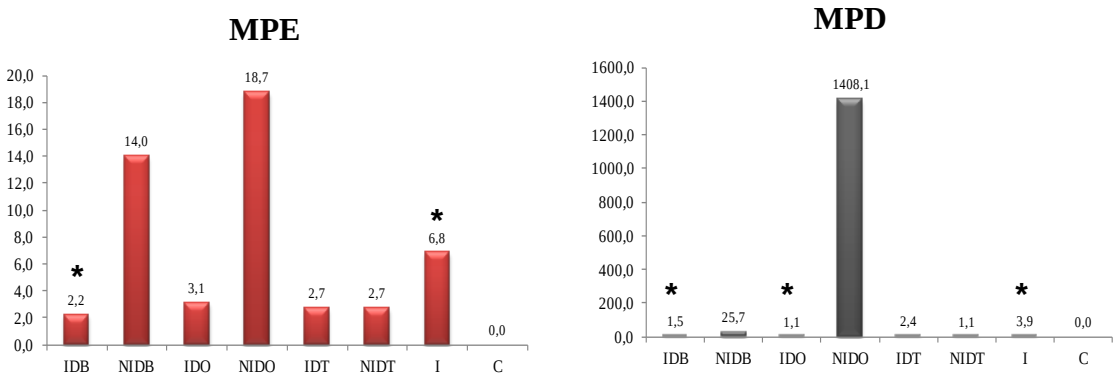


Figura 25. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de membro posterior esquerdo (MPE) e membro posterior direito (MPD), nos oito grupos experimentais, **experimento II.** *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Botucatu, SP, 2013.

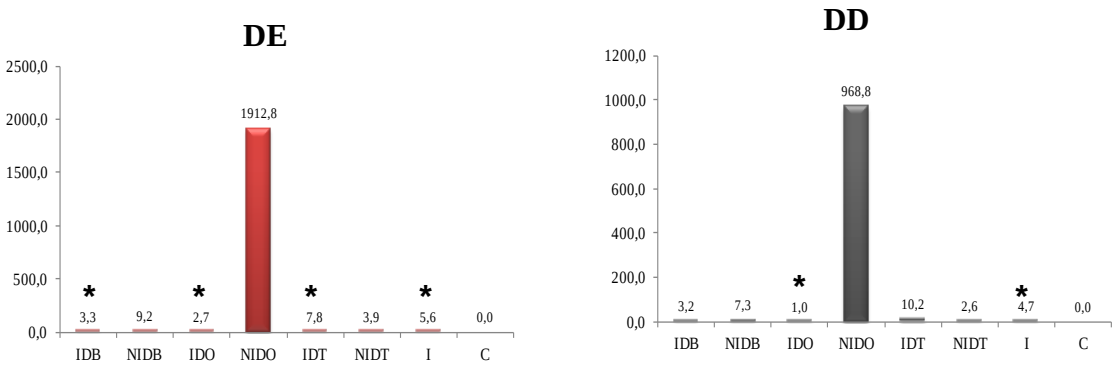


Figura 26. Mediana da carga parasitária de *T. gondii* em amostras de tecido muscular de dorso esquerdo (DE) e dorso direito (DD), nos oito grupos experimentais, **experimento II.** *Grupo imunizado difere do não imunizado ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis. Botucatu, SP, 2013.

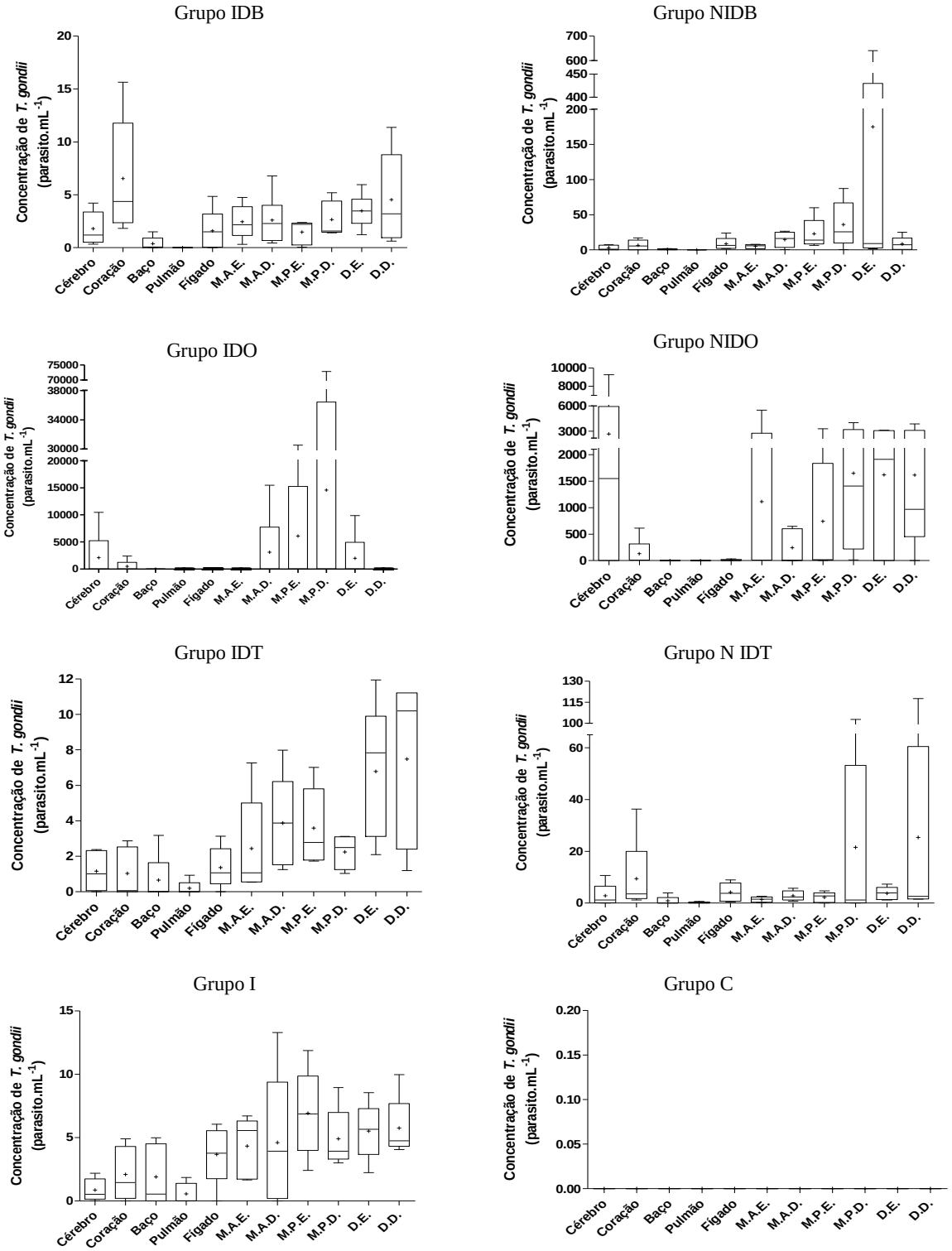


Figura 27. Mediana e variação interquartil (⊟), limites mínimo e máximo (⊢), e média (+) da carga parasitária entre os tecidos analisados para cada grupo do experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Tabela 15. Análise estatística, medianas e percentil de 25% (P25) e de 75% (P75) de carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* entre grupos imunizados e não imunizados do experimento II, independentemente do tecido analisado. Botucatu, SP, 2013.

Grupos	Mediana (parasito.mL^{-1})	P25-P75 (parasito.mL^{-1})	Min.-Max. (parasito.mL^{-1})	Estatística U*	Valor de *P*†
IDB	2,70^{A}	1,76 – 4,25	1,20 – 15,62	274,00	<0,0001
NIDB	8,43^{B}	5,88 – 23,82	1,23 – 640,99		
IDO	4,54^{A}	2,53 – 20,99	1,07 – 72838,00	502,50	0,0052
NIDO	24,98^{B}	24,97 – 1639,62	1,31 – 9279,10		
IDT	2,87^{A}	1,79 – 4,60	1,01 – 11,95	643,00	0,8039
NIDT	3,19^{A}	3,18 – 4,74	1,05 – 117,66		
I	4,95	4,94 – 5,94	1,3 – 13,3	-	-
C	0,00	0,00 – 0,00	0,00 – 0,00		

Legenda: * Teste não paramétrico de Mann-Whitney (U); † Valor de *P* para um nível de significância de 5%.

Tabela 16. Perfil de natalidade e infecção congênita em ratas dos grupos experimentais, com respectiva mediana de carga parasitária e percentil de 25% (P25) e de 75% (P75) para *T. gondii* nos neonatos do experimento II, comparando-se grupo imunizado com não imunizado, de acordo com a forma infectante inoculada. Botucatu, SP, 2013.

Grupo	Total de filhotes	Média	% natalidade	Total de infectados	% infectados	Mediana de carga parasitária (parasitos.mL^{-1})	P25 – P75
IDB	32	6,40	60,00	0	0,00	0,00	0,00 – 0,00
NIDB	38	7,60	60,00	1	5,26	7,87	7,87 – 7,87
IDO	32	6,40	60,00	0	0,00	0,00	0,00 – 0,00
NIDO	38	7,60	80,00	1	5,26	1,38	1,38 – 1,38
IDT	28	5,60	60,00	1	7,14	1,97	1,97 – 1,97
NIDT	28	5,60	60,00	2	14,29	2,33	1,47 – 2,99
I	32	6,40	60,00	1	6,25	1,01	1,01 – 1,01
C	32	6,40	60,00	0	0,00	0,00	0,00 – 0,00

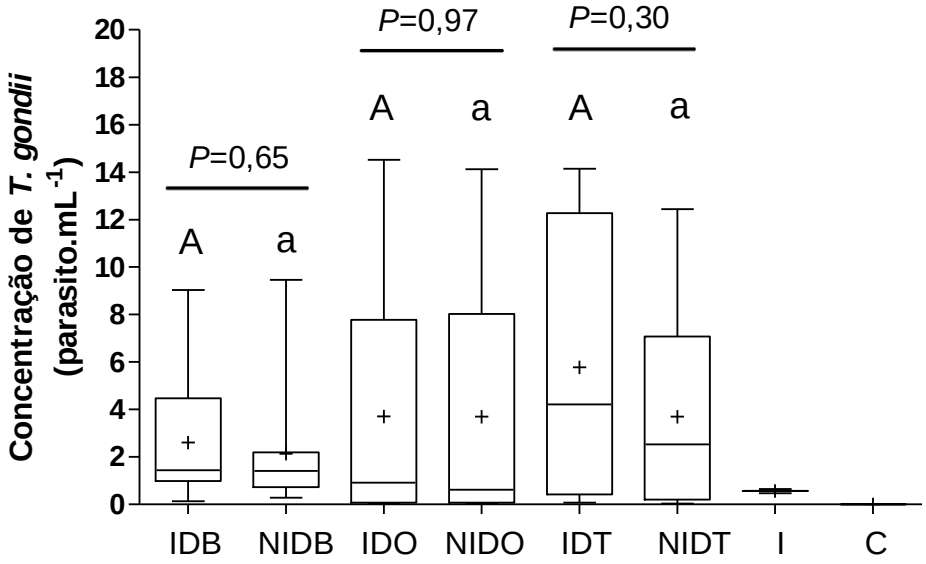
Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com cistos.
NIDB- Ratas não imunizadas desafiadas com cistos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle, Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 17. Quantificação da carga parasitária pela qPCR para *T. gondii* em cinco colheitas de leite, experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Grupo	Colheita leite (parasito.mL^{-1})				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
IDB	2,0 ± 2,7a	3,3 ±4,9a	2,0 ± 2,1a	0,9 ± 0,8a	0,5 ± 0,8b
NIDB	0,8 ± 1,7a	0,3 ± 0,4a	2,9 ± 4,4a	1,2 ± 0,3a	0,5 ± 0,8b
IDO	1,0 ±1,1a	4,9 ± 8,4a	2,0 ± 3,3a	0,0 ±0,0a	3,2 ± 5,6ab
NIDO	3,5 ±7,1a	0,9 ± 1,6a	3,7 ± 6,1a	0,2 ± 0,3a	0,0 ± 0,0b
IDT	4,4 ±7,7a	6,3 ±4,9a	1,1 ± 1,4a	1,4 ± 2,0a	9,9 ±3,2ª
NIDT	0,0 ± 0,0a	0,0 ± 0,0a	0,2 ± 0,4a	1,7 ± 1,4a	3,1 ± 3,5ª
I	0,0 ± 0,0a	0,0 ± 0,0a	0,2 ± 0,4a	0,2 ± 0,3a	0,0 ± 0,0b
C	0,0 ± 0,0a	0,0 ± 0,0a	0,0 ± 0,0a	0,0 ± 0,0a	0,0 ± 0,0b
P	0,765	0,506	0,773	0,133	0,007

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas .
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.



Estatística: teste de Kruskal-Wallis [G1:G3:G5 (KW=2,455; *P*=0,4834); G2:G4:G6 (KW=0,2772; *P*=0,8706)
teste t de Student (comparações a cada 2 grupos)

Figura 28. Mediana e variação interquartil (⊟), limites mínimo e máximo (⊢), e média (+) da carga parasitária presente no leite das ratas do experimento II, de acordo com os grupos estudados. Botucatu, SP, 2013.

5.2.2. Sorologia

No experimento II, igualmente ao verificado no primeiro experimento, a produção de IgM teve início sete dias após a primeira dose da vacina, em todos os grupos imunizados (Tabela 18; Figura 29). Nos grupos não imunizados a produção foi verificada após desafio (colheita 8) (Tabela 18; Figura 29). Após o desafio, foram observados títulos de anticorpos mais elevados nos grupos imunizados em relação aos não imunizados, em todos os desafios. No desafio com oocistos estes títulos foram significativamente superiores nas colheitas 11, 12 e 13 (Tabela 18).

A produção de IgA comportou-se semelhantemente a de IgM, com início da produção, sete dias após o desafio (Tabela 19; Figura 29). Nos grupos não imunizados, tal fato ocorreu sete dias após o desafio (coleta 8). Não houve diferença significativa nos níveis desta imunoglobulina, após desafio, entre os animais imunizados e não imunizados, desafiados com bradizoítos, taquizoítos e oocistos, com exceção da coleta 10 para oocistos entre ratas imunizadas e não imunizadas (Tabela 19; Figura 29).

Quanto a IgG, o início da detecção ocorreu 14 dias após a vacinação, para todos os grupos imunizados (Tabela 20). Após o desafio seus níveis foram superiores nas colheitas 11 e 12 no grupo de animais imunizados e desafiados com oocistos em relação às ratas que não receberam a vacina ($P<0,05$). Não houve diferença na produção de IgG nos grupos imunizados e não imunizados, submetidos ao desafio com taquizoítos e bradizoítos, após o desafio (Tabela 20; Figura 29).

Tabela 18. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta para anticorpos da classe IgM (RIFI-IgM), nos diferentes grupos analisados, experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Aa	1,0
2	1,2 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Bc	1,4 ± 0,3Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,3 ± 0,2Abc	0,0 ± 0,0Bc	1,3 ± 0,2Ac	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
3	1,5 ± 0,3Aabc	0,0 ± 0,0Bc	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bb	1,5 ± 0,3Aabc	0,0 ± 0,0Bc	1,4 ± 0,3Ac	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
4	1,5 ± 0,3Aabc	0,0 ± 0,0Bc	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bb	1,5 ± 0,3Aabc	0,0 ± 0,0Bc	1,8 ± 0,0Aabc	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
5	1,5 ± 0,3Aabc	0,0 ± 0,0Bc	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Bb	1,8 ± 0,4Aab	0,0 ± 0,0Bc	2,0 ± 0,3Aab	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
6	1,4 ± 0,3Bbc	0,0 ± 0,0Cc	1,8 ± 0,0ABa	0,0 ± 0,0Cb	1,5 ± 0,3Babc	0,0 ± 0,0Cc	2,1 ± 0,3Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
7	2,0 ± 0,3Aa	0,0 ± 0,0Cc	1,8 ± 0,0ABa	0,0 ± 0,0Cb	1,9 ± 0,2ABa	0,0 ± 0,0Cc	2,0 ± 0,3Aab	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
8	2,0 ± 0,3Aa	1,6 ± 0,2Aab	1,8 ± 0,0Aa	1,5 ± 0,3ABa	2,0 ± 0,3Aa	1,6 ± 0,2Aa	1,8 ± 0,5Aab	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
9	2,0 ± 0,3Aa	1,9 ± 0,2Aa	1,8 ± 0,0Aa	1,5 ± 0,3Aa	1,8 ± 0,4Aab	1,6 ± 0,2Aa	1,5 ± 0,3Abc	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
10	1,9 ± 0,2Aab	1,9 ± 0,2Aa	1,8 ± 0,0ABa	1,5 ± 0,3ABa	1,3 ± 0,2Bbc	1,4 ± 0,3ABab	1,6 ± 0,2ABabc	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
11	1,8 ± 0,4ABab	1,9 ± 0,2Aa	1,8 ± 0,0ABa	1,4 ±0,3BCa	1,2 ± 0,0Cc	1,2 ± 0,0Cb	1,8 ± 0,0ABabc	0,0 ± 0,0Da	<0,001
12	1,8 ± 0,4Aab	1,8 ± 0,0Aab	1,8 ± 0,0Aa	1,5 ± 0,3ABa	1,2 ± 0,0Bc	1,3 ± 0,2ABab	1,45 ± 0,3ABc	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
13	1,6 ± 0,4ABabc	1,4 ± 0,3ABb	1,8 ± 0,0Aa	1,5 ± 0,3ABa	1,2 ± 0,0Bc	1,3 ± 0,2ABab	1,4 ± 0,3ABc	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 19. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta para anticorpos da classe IgA (RIFI-IgA), nos diferentes grupos analisados, experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Aa	1,0
2	1,3 ± 0,2Bc	0,0 ± 0,0Cb	1,2 ± 0,0Bb	0,0 ± 0,0Cc	1,5 ± 0,3ABab	0,0 ± 0,0Cb	1,8 ± 0,4Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
3	1,6 ± 0,2Aab	0,0 ± 0,0Bb	1,6 ± 0,2Aab	0,0 ± 0,0Bc	1,5 ± 0,3Aab	0,0 ± 0,0Bb	1,6 ± 0,4Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
4	1,6 ± 0,2Aab	0,0 ± 0,0Bb	1,6 ± 0,2Aab	0,0 ± 0,0Bc	1,5 ± 0,3Aab	0,0 ± 0,0Bb	1,9 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
5	1,5 ± 0,3Aab	0,0 ± 0,0Bb	1,5 ± 0,3Aab	0,0 ± 0,0Bc	1,6 ± 0,2Aab	0,0 ± 0,0Bb	1,9 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
6	1,4 ± 0,3Bb	0,0 ± 0,0Cb	1,6 ± 0,2ABab	0,0 ± 0,0Cc	1,5 ± 0,3ABab	0,0 ± 0,0Cb	1,9 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
7	2,0 ± 0,3Aa	0,0 ± 0,0Cb	1,8 ± 0,4Aa	0,0 ± 0,0Cc	1,9 ± 0,2Aab	0,0 ± 0,0Cb	1,9 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
8	2,0 ± 0,3Aa	1,8 ± 0,4Aa	1,8 ± 0,4Aa	2,1 ± 0,3Aa	2,0 ± 0,3Aab	1,6 ± 0,2Aa	1,9 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
9	2,0 ± 0,3Aa	2,0 ± 0,3Aa	1,8 ± 0,4Aa	2,1 ± 0,3Aa	1,8 ± 0,4Aab	1,8 ± 0,0Aa	1,9 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
10	1,9 ± 0,2ABab	1,9 ± 0,2ABa	1,8 ± 0,4ABa	2,1 ± 0,3Aa	1,4 ± 0,3Bb	1,6 ± 0,2ABa	1,8 ± 0,0ABa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
11	1,9 ± 0,2Aab	1,9 ± 0,2Aa	1,9 ± 0,2Aa	1,8 ± 0,5Aab	1,4 ± 0,3Ab	1,4 ± 0,3Aa	1,9 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
12	1,8 ± 0,4Aab	1,9 ± 0,2Aa	1,9 ± 0,2Aa	1,6 ± 0,4Aab	1,4 ± 0,3Ab	1,5 ± 0,3Aa	1,8 ± 0,4Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
13	1,6 ± 0,2Aab	1,6 ± 0,2Aa	1,9 ± 0,2Aa	1,6 ± 0,4Aab	1,4 ± 0,3Ab	1,4 ± 0,3Aa	1,6 ± 0,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 20. Média ± desvio-padrão para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de ratas pela e Reação de Imunofluorescência Indireta para anticorpos da classe IgG (RIFI-IgG), nos diferentes grupos analisados, experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ae	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Aa	1,0
2	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ac	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Ad	0,0 ± 0,0Ae	0,0 ± 0,0Ab	0,0 ± 0,0Aa	1,0
3	1,5 ± 0,3Abc	0,0 ± 0,0Bb	1,5 ± 0,3Ab	0,0 ± 0,0Bb	1,5 ± 0,3Aabc	0,0 ± 0,0Be	1,8 ± 0,0Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
4	1,3 ± 0,2Bc	0,0 ± 0,0Cb	1,5 ± 0,3Bb	0,0 ± 0,0Cb	1,5 ± 0,3Babc	0,0 ± 0,0Ce	2,2 ± 0,6Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
5	1,4 ± 0,3Bc	0,0 ± 0,0Cb	1,8 ± 0,5ABb	0,0 ± 0,0Cb	1,5 ± 0,3Babc	0,0 ± 0,0Ce	2,4 ± 0,5Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
6	1,4 ± 0,3Bc	0,0 ± 0,0Cb	1,9 ± 0,2ABb	0,0 ± 0,0Cb	1,8 ± 0,4ABabc	0,0 ± 0,0Ce	2,2 ± 0,6Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
7	2,1 ± 0,6ABab	0,0 ± 0,0Cb	1,9 ± 0,2ABb	0,0 ± 0,0Cb	1,6 ± 0,4Babc	0,0 ± 0,0Ce	2,4 ± 0,5Aa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
8	2,4 ± 0,5ABa	0,0 ± 0,0Cb	2,6 ± 0,3Aa	0,0 ± 0,0Cb	1,8 ± 0,0Babc	0,0 ± 0,0Ce	2,4 ± 0,5ABa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
9	2,1 ± 0,3Aab	2,1 ± 0,3Aa	2,6 ± 0,3Aa	2,0 ± 0,6Aa	2,1 ± 0,3Aa	2,1 ± 0,3Aa	2,1 ± 0,8Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
10	2,1 ± 0,3Aab	2,1 ± 0,3Aa	2,8 ± 0,2Aa	2,1 ± 0,5Aa	1,9 ± 0,2Aab	2,0 ± 0,3Aab	2,2 ± 1,2Aa	0,0 ± 0,0Ba	<0,001
11	2,1 ± 0,3BCab	2,4 ± 0,4ABa	3,1 ± 0,5Aa	2,0 ± 0,5BCa	1,3 ± 0,2Cbc	1,3 ± 0,2Ccd	2,1 ± 0,7BCa	0,0 ± 0,0Da	<0,001
12	2,1 ± 0,6Bab	2,4 ± 0,4ABa	3,1 ± 0,5Aa	2,1 ± 0,5Ba	1,2 ± 0,0Cc	1,2 ± 0,0Cd	2,2 ± 0,6ABa	0,0 ± 0,0Da	<0,001
13	2,1 ± 0,5ABab	2,4 ± 0,4ABa	2,8 ± 0,5Aa	2,0 ± 0,6ABa	1,4 ± 0,3Bbc	1,4 ± 0,3Bcd	2,2 ± 0,6ABa	0,0 ± 0,0Ca	<0,001
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1,000	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

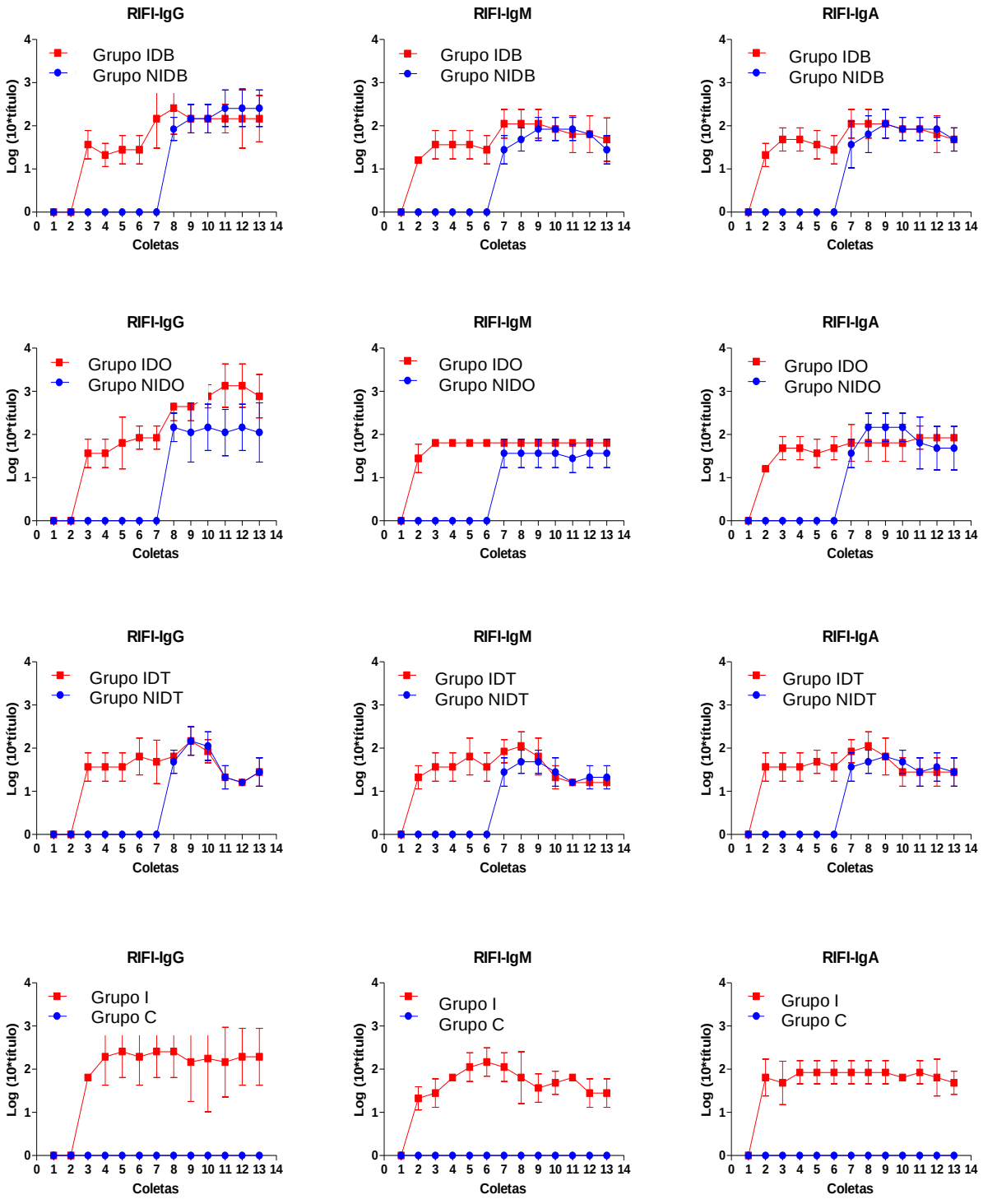


Figura 29. Variação entre média e desvio padrão das concentrações de anticorpos IgG, IgM e IgA de acordo com o grupo estudado do Experimento II. Botucatu, SP, 2013.

5.2.3. Contagem de cistos cerebrais

Não houve diferença na contagem média de cistos cerebrais entre os grupos imunizados e não imunizados, desafiados com bradizoítos (Figura 30). No desafio por oocistos, o grupo não imunizado apresentou maior contagem de cistos (Figura 30). Enquanto que nos grupos desafiados com taquizoítos, imunizado e não imunizado, não se detectou a presença de cistos na contagem microscópica convencional, assim como no grupo somente imunizado e controle (Figura 30).

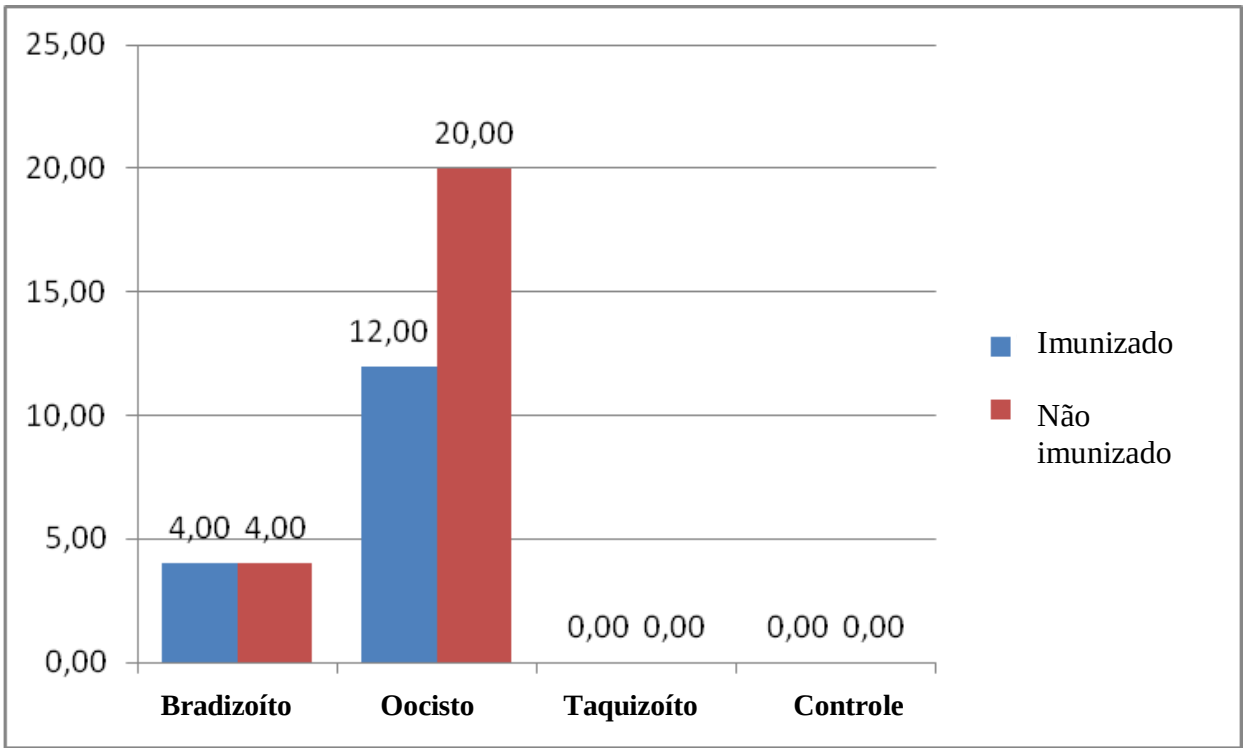


Figura 30. Média de cistos teciduais observados nos tecidos das ratas de acordo com o grupo estudado para o experimento II. Botucatu, SP, 2013.

5.2.4. Leucograma

Leucócitos:

Após a primeira dose de vacina observou-se aumento significativo na contagem total de leucócitos no grupo imunizado e desafiado com bradizoítos (Tabela 21). No decorrer das colheitas de sangue, o número de células oscilou principalmente após o desafio, que se manteve elevado até a colheita 12, com declínio acentuado, de 9070 para 6500 céluasl/μL na colheita 13. O grupo imunizado apresentou contagem celular superior ao não imunizado nas colheitas 8, 9 e 10 (Tabela 21).

As ratas desafiadas com oocistos apresentaram contagem superior de linfócitos, após a primeira dose da vacina em relação ao não imunizado (Tabela 21). Na colheita 7, observou-se o contrário, pois a contagem desta célula foi superior no grupo não imunizado.

Nos grupos desafiados com taquizoítos, houve aumento significativo na produção de leucócitos na colheita sete, após o desafio, com valores superiores no grupo não imunizado (Tabela 21).

Linfócitos:

Nos grupos imunizados e desafiados com bradizoítos, taquizoítos e bradizoítos observou-se aumento na contagem de linfócitos em resposta a primeira dose da vacina (Tabela 22). No grupo desafiado com oocisto não houve diferença estatística após a primeira vacina (Tabela 22). No grupo de ratas desafiadas com bradizoítos, após o desafio (colheita 8) ocorreu aumento na contagem de linfócitos nas ratas imunizadas, em comparação com as não imunizadas. O mesmo não foi observado nos desafios com as formas infectantes de oocistos e taquizoítos, de *T. gondii* (Tabela 22).

Neutrófilos:

A resposta a primeira dose da vacina também promoveu aumento na contagem de neutrófilos, sem diferença significativa para o grupo IDB (Tabela 23). Nas demais colheitas, não se observou diferença entre os grupos imunizados e não imunizados, frente aos diferentes desafios (Tabela 23).

Monócitos:

Houve aumento significativo de monócitos entre a primeira e segunda colheita nos grupos IDB e IDT (Tabela 24). Apesar de ter se observado aumento no número de monócitos no grupo IDO, este não foi estatisticamente significativo (Tabela 24). Nas colheitas 4 e 10 do grupo IDB, colheitas 6, 7 e 8 do grupo IDO, e 4, 6 e 10 de IDT, encontrou-se número significativamente superior destas células em relação aos respectivos grupos não imunizados (Tabela 24).

Tabela 21. Valores médios de leucócitos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	5200,0 ± 1598,8Cc	8270,0 ± 976,3Aa	7850,0 ± 858,0ABa	5650,0 ± 1605,4BCa	5000,0 ± 834,4Cc	7900,0 ± 849,2ABbcd	5220,0 ± 1263,7Cb	7240,0 ± 1045,4ABCa	<0,001
2	7330, 0 ± 1413,1Aabc	7510,0 ± 714,4Aab	7750,0 ± 918,5AAa	6840,0 ± 1648,2Aa	6320,0 ± 942,4Abc	8240,0 ± 725,7 Aabcd	6990,0 ± 1712,6Aab	7480,0 ± 513,0Aa	0,282
3	9810,0 ± 1867,2Aa	7250,0 ± 1648,1Aab	8900,0 ± 1589,4Aa	9570,0 ± 3664,6Aa	9890,0 ± 2036,6Aa	8660,0 ± 808,8 Aabcd	10040,0 ± 954,9Aa	7970,0 ± 954,9Aa	0,291
4	7610,0 ± 1228,0Aabc	7300,0 ± 1523,5Aab	7500,0 ± 577,7Aa	8690,0 ± 2530,6Aa	8970,0 ± 1056,2Aab	7400,0 ± 1509,5Abcd	9330,0 ± 1447,2Aa	7980,0 ± 837,1Aa	0,207
5	7120,0 ± 2390,5Aabc	7110,0 ± 1834,5Aab	6920,0 ± 1834,5Aa	8570,0 ± 1565,4Aa	8750,0 ± 2962,2Aab	6560,0 ± 1873,9Ad	8160,0 ± 1474,1Aab	8250,0 ± 1350,4Aa	0,516
6	5980,0 ± 1548,6Abc	6660,0 ± 518,8Aab	5930,0 ± 1143,2Aa	7720,0 ± 1001,6Aa	7490,0 ± 1473,2Aabc	6700,0 ± 1496,2d	8070,0 ± 1354,4Aab	7490,0 ± 1697,9Aa	0,114
7	7550,0 ± 1680,7BCabc	8150,0 ± 866,7ABCa	7030,0 ± 1128,9BCa	8490,0 ± 1142,0ABCa	10120,0 ± 1321,7ABa	11270,0 ± 1263,7Aab	6390,0 ± 2371,0Cab	7000,0 ± 2924,8BCa	<0,001
8	8160,0 ± 516,4ABabc	7360,0 ± 1088,2Bab	8400,0 ± 1683,3ABa	8400,0 ± 909,3ABa	10150,0 ± 974,0ABa	10820,0 ± 1264,2Aabc	7430,0 ± 2048,9Bab	7430,0 ± 1886,0Ba	0,002
9	9070,0 ± 609,9ABab	7180,0 ± 1069,8Bab	9440,0 ± 2543,4ABa	9030,0 ± 1928,2ABa	9690,0 ± 1314,5ABa	11600,0 ± 2700,0Aa	9470,0 ± 1177,1ABa	8630,0 ± 836,3ABa	0,028
10	8420,0 ± 769,4ABabc	7140,0 ± 1028,5Bab	8400,0 ± 2165,9ABa	9120,0 ± 1143,7ABa	8960,0 ± 1092,8Aab	10460,0 ± 1802,9AB	8950,0 ± 1252,9AB	8070,0 ± 983,3ABa	0,036
11	8270,0 ± 1474,6Aabc	7180,0 ± 1670,1Aab	7670,0 ± 2592,4Aa	9270,0 ± 1498,5Aa	8830,0 ± 1480,9Aab	10250,0 ± 2425,9Aabcd	8430,0 ± 2044,6Aab	7910,0 ± 924,2Aa	0,242
12	9070,0 ± 609,9Aab	6670,0 ± 1358,5Aab	8200,0 ± 1811,4Aa	8990,0 ± 1883,9Aa	9360,0 ± 1232,0Aa	9570,0 ± 2158,8 Aabcd	9870,0 ± 1319,3Aa	8630,0 ± 836,3Aa	0,052
13	6500,0 ± 2952,5Aabc	4760,0 ± 1548,9Ab	6960,0 ± 1969,5Aa	6080,0 ± 1811,2Aa	7650,0 ± 1193,2Aabc	7400,0 ± 1680,7Acd	8840,0 ± 2430,3Aab	7730,0 ± 1772,2Aa	0,099
P	0,003	0,037	0,207	0,039	<0,001	<0,001	0,002	0,859	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 22. Valores médios de linfócitos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	4420,4 ± 1315,7BCbc	7043,8 ± 856,7Aa	6528,4 ± 910,7ABa	4800,6 ± 1415,2ABCbc	4226,4 ± 778,0Cb	6194,0 ± 1263,6$_{ABCabcd}$	4183,2 ± 1100,5Cef	6205,2 ± 972,0ABCa	<0,001
2	5580,0 ± 1132,2Aabc	6132,2 ± 650,8Aab	6306,0 ± 986,2Aa	5613,4 ± 1380,6Aabc	5099,2 ± 909,1Aab	6460,8 ± 1048,2A$_{abcd}$	5374,2 ± 1353,9Abcdef	6225,0 ± 461,9Aa	0,359
3	6994,0 ± 1383,4Aa	5356,0 ± 726,3Abc	6448,6 ± 1248,7Aa	7482,2 ± 2806,4Aa	7274,4 ± 1860,7Aa	6536,8 ± 932,0A$_{abcd}$	7339,8 ± 1330,5Aa	6280,4 ± 785,8Aa	0,400
4	5561,4 ± 605,7Aabc	5469,2 ± 858,7Aabc	5547,4 ± 426,5Aa	6888,6 ± 2082,5Aa	6664,6 ± 774,4Aab	5488,8 ± 1254,6A$_{abcd}$	6816,0 ± 1084,6Aab	6413,2 ± 654,8Aa	0,127
5	4834,0 ± 819,7Abc	4961,2 ± 1215,7Abcd	5110,6 ± 1452,7Aa	6790,4 ± 1531,6Aab	6296,4 ± 2332,0Aab	4713,8 ± 1452,0Abcd	5689,6 ± 876,9Abcde	6615,0 ± 1004,6Aa	0,127
6	4053,0 ± 928,9Ac	4302,9 ± 443,4Acd	3926,0 ± 1021,1Aa	5751,8 ± 911,7Aab	5219,4 ± 882,8Aab	4383,6 ± 1237,7Ad	5109,4 ± 743,9Acdef	5436,8 ± 1231,5Aa	0,030
7	4643,6 ± 1129,5ABCbc	5510,2 ± 486,2ABCabc	4335,9 ± 986,8BCa	6374,8 ± 974,9ABCab	6921,8 ± 1234,9ABa	7014,5 ± 1291,5Aabc	3910,1 ± 1514,5Cf	4602,6 ± 2126,6ABCa	0,002
8	5296,6 ± 591,7ABCabc	4662,2 ± 351,1Cbcd	5285,4 ± 973,2ABCa	6435,6 ± 959,2ABCab	6798,0 ± 1274,7ABab	7146,6 ± 784,1Aab	4629,8 ± 1251,9Cdef	4948,0 ± 1437,8BCa	<0,001
9	6063,7 ± 895,6Aab	4307,6 ± 406,5Acd	6000,1 ± 2299,7Aa	5970,8 ± 1228,3Aab	5736,9 ± 1330,2Aab	7504,5 ± 2330,9Aa	5912,6 ± 791,6Aabcd	5871,2 ± 837,5Aa	0,118
10	5666,6 ± 886,2Aabc	4540,4 ± 710,6Abcd	5382,4 ± 1747,4Aa	6272,6 ± 662,0Aab	5413,8 ± 443,5Aab	6772,6 ± 2146,9A$_{abcd}$	6293,4 ± 1148,4Aabc	5892,6 ± 948,0Aa	0,166
11	5675,5 ± 1303,1Aabc	4634,4 ± 1381,0Abcd	4788,8 ± 1892,4Aa	6199,0 ± 1015,6Aab	6141,5 ± 1215,8Aab	6440,6 ± 2404,6A$_{abcd}$	6524,0 ± 2000,2Aabc	6081,6 ± 793,4Aa	0,419
12	6223,2 ± 581,9Aab	4650,2 ± 979,8Abcd	5093,4 ± 1209,6Aa	5891,6 ± 1467,9Aab	6529,6 ± 1024,7Aab	6172,2 ± 2342,2A$_{abcd}$	7312,8 ± 1391,5Aa	6625,0 ± 683,6Aa	0,072
13	4372,3 ± 1790,6ABbc	3365,8 ± 1065,6Bd	4067,9 ± 815,6ABa	3607,1 ± 1049,0ABc	5249,1 ± 1131,0ABab	4458,1 ± 628,6ABcd	6279,2 ± 2311,0Aabc	5712,9 ± 1632,1ABa	0,028
P	<0,001	<0,001	0,008	<0,001	0,005	<0,001	<0,001	0,046	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB – Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 23. Valores médios de neutrófilos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	663,0 ± 222,5Bb	974,6 ± 448,8ABc	1169,2 ± 515,5ABe	702,6 ± 207,7ABc	692,0 ± 156,1ABe	1451,8 ± 671,8Ac	872,0 ± 316,9ABd	844,8 ± 219,6ABd	0,035
2	1322,2 ± 343,2Aab	1113,0 ± 181,8Abc	1223,0 ± 364,9Ae	1026,4 ± 193,8Abc	813,2 ± 245,7Ade	1486,8 ± 500,4Abc	1315,4 ± 361,5Acd	1047,4 ± 132,8Acd	0,052
3	2013,6 ± 454,7Aab	1660,6 ± 1011,2Aabc	2010,0 ± 303,3Aabcde	1455,0 ± 830,4Aabc	1801,8 ± 568,1Acde	1717,8 ± 379,4Aabc	2126,2 ± 766,3Aabc	1364,0 ± 160,0Abcd	0,471
4	1428,2 ± 699,9Aab	1589,8 ± 746,6Aabc	1636,4 ± 221,5Abcde	1316,4 ± 358,9Abc	1731,4 ± 348,8Acde	1650,8 ± 461,6Abc	2101,4 ± 549,9Aabc	1339,8 ± 250,3Abcd	0,266
5	1800,0 ± 1900,5Aab	1884,4 ± 835,8Aabc	1380,6 ± 229,7Ade	1304,8 ± 306,6Abc	1973,2 ± 1043,0Abcd	1456,8 ± 505,4Ac	2139,4 ± 797,8Aabc	1347,2 ± 488,5Abcd	0,724
6	1590,6 ± 730,1ABab	1880,5 ± 247,1ABabc	1559,6 ± 156,0ABcde	1666,8 ± 380,0ABabc	1971,0 ± 934,8ABbcd	2107,9 ± 502,8ABabc	2670,4 ± 635,5Aab	1518,4 ± 360,3Babcd	0,038
7	2374,2 ± 681,9Aa	2170,4 ± 736,6Aabc	2045,0 ± 302,7Aabcde	1610,6 ± 688,8Aabc	2666,3 ± 1328,4Aabc	3909,1 ± 1667,0Aa	2146,3 ± 969,8Aabc	2245,9 ± 1106,7Aab	0,057
8	2436,8 ± 217,0Aa	2377,8 ± 770,8Aabc	2636,6 ± 701,6Aabcd	1927,6 ± 784,5Aabc	2906,4 ± 1009,7Aabc	3285,2 ± 1542,8Aabc	2489,0 ± 817,3Aab	2262,2 ± 617,3Aab	0,388
9	2735,0 ± 857,4Aa	2580,5 ± 1022,7Aa	2952,9 ± 715,2Aa	2426,2 ± 1269,3Aab	3359,7 ± 800,1Aa	3666,4 ± 1918,3Aab	3014,7 ± 591,5Aa	2409,7 ± 588,0Aa	0,517
10	2452,4 ± 626,2ABa	2428,8 ± 496,0ABab	2732,6 ± 521,9ABabc	2482,6 ± 878,9ABab	3225,4 ± 816,7ABab	3406,0 ± 1043,8Aabc	2378,8 ± 279,3ABabc	1988,0 ± 325,8Babc	0,041
11	2344,2 ± 826,2ABa	2331,7 ± 586,6ABabc	2688,4 ± 749,6ABabc	2855,8 ± 773,0ABa	2401,7 ± 459,9ABabc	3452,0 ± 1235,9Aabc	1713,2 ± 502,0Bbcd	1706,2 ± 260,5Babcd	0,012
12	2665,4 ± 736,8Aa	1823,4 ± 608,8Aabc	2910,4 ± 708,3Aab	2902,4 ± 618,2Aa	2500,8 ± 313,8Aabc	2976,8 ± 753,4Aabc	2245,0 ± 300,8Aabc	1832,4 ± 636,0Aabc	0,009
13	1997,7 ± 1133,3Aab	1237,4 ± 646,9Aabc	2579,0 ± 1327,9Aabcd	2310,1 ± 1098,3Aab	2041,8 ± 405,1Acde	2564,1 ± 1074,6Aabc	2242,0 ± 429,6Aabc	1900,7 ±772,5Aabc	0,386
P	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB -Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

Tabela 24. Valores médios de monócitos (células/μL) (± desvio padrão) de ratas imunizadas e desafiadas (IDB, IDO,IDT), não imunizadas desafiadas (NIDB,NIDO,NIDT), imunizadas (I) e controle (C), experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Coleta	GRUPOS								*P*
	IDB	**NIDB**	**IDO**	**NIDO**	**IDT**	**NIDT**	**I**	**C**	
1	116,6 ± 119,9Ad	251,6 ± 141,3Aab	152,4 ± 177,1Ab	146,8 ± 143,9Ac	81,6 ± 48,3Ac	254,2 ± 226,1Aa	164,8 ± 109,3Ac	190,0 ± 133,4Aab	0,544
2	427,0 ± 130,3Aabcd	264,8 ± 111,8Aab	221,0 ± 103,7Ab	200,2 ± 115,2Abc	407,6 ± 177,7Aabc	292,4 ± 189,0Aa	300,4 ± 135,2Aabc	207,6 ± 76,5Aab	0,074
3	802,4 ± 439,6Aa	233,4 ± 173,5Aab	441,4 ± 196,3Aab	632,8 ± 300,9Aa	813,8 ± 458,7Aa	405,4 ± 266,3Aa	574,0 ± 389,8Aa	325,6 ± 233,4Aa	0,063
4	620,4 ± 128,1Aab	241,0 ± 115,2Cab	316,2 ± 53,0ABCab	485,0 ± 200,4ABCab	574,0 ± 262,0ABab	260,4 ± 68,1BCa	412,6 ± 187,0ABCabc	227,0 ± 102,6Cab	<0,001
5	486,0 ± 219,8Aabcd	264,4 ± 109,2Aab	428,8 ± 191,5Aab	474,8 ± 187,8Aabc	479,2 ± 285,7Aabc	389,4 ± 201,9Aa	331,0 ± 197,1Aabc	287,8 ± 124,6Aab	0,432
6	336,4 ± 129,3ABbcd	476,6 ± 204,4Aa	444,4 ± 58,6Aab	301,4 ± 92,7ABbc	299,6 ± 58,9ABbc	208,5 ± 120,5Ba	290,2 ± 89,3ABabc	206,8 ± 87,7Bab	0,005
7	532,2 ± 232,3ABabc	469,4 ± 134,0ABa	649,1 ± 227,1Aa	504,6 ± 241,6ABab	531,9 ± 263,7ABabc	346,4 ± 263,6ABa	238,6 ± 124,2ABabc	151,5 ± 58,0Bab	0,009
8	426,6 ± 154,4ABabcd	320,0 ± 52,0ABab	478,0 ± 182,2Aab	316,8 ± 78,4ABbc	445,6 ± 91,4ABabc	388,2 ± 105,0ABa	311,2 ± 138,0ABabc	219,8 ± 86,3Bab	0,028
9	271,3 ± 144,3Abcd	291,9 ± 151,2Aab	487,0 ± 263,1Aab	633,0 ± 187,2Aa	593,4 ± 330,3Aab	429,1 ± 114,5Aa	542,7 ± 263,1Aab	349,1 ± 86,1Aa	0,064
10	301,0 ± 73,8ABbcd	170,8 ± 64,3Bb	285,0 ± 113,8ABb	364,8 ± 45,7Aabc	320,8 ± 85,5ABbc	281,4 ± 79,7ABAa	277,8 ± 77,1ABabc	189,4 ± 52,9Bab	0,006
11	250,3 ± 126,8Abcd	213,9 ± 249,4Aab	192,8 ± 175,1Ab	215,2 ± 51,2Abc	286,8 ± 116,0Abc	357,4 ± 153,4Aa	192,8 ± 41,4Abc	122,2 ± 69,7Ab	0,292
12	181,4 ± 12,1Bcd	196,4 ± 142,4Bab	196,2 ± 79,0Bb	196,0 ± 44,8Bbc	329,6 ± 64,9ABbc	421,0 ± 163,9Aa	312,2 ± 107,8ABabc	172,6 ± 16,7Bab	0,001
13	130,0 ± 59,0Acd	156,8 ± 111,9Ab	313,1 ± 163,9Aab	162,8 ± 131,0Ac	359,1 ± 69,2Abc	377,8 ± 271,0Aa	318,8 ± 79,2Aabc	116,4 ± 71,2Ab	0,010
P	<0,001	0,007	<0,001	<0,001	<0,001	0,626	0,010	0,003	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Legenda:
IDB - Ratas imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
NIDB- Ratas não imunizadas e desafiadas com bradizoítos.
IDO- Ratas imunizadas e desafiadas com oocistos.
NIDO- Ratas não imunizadas desafiadas com oocistos.
IDT- Ratas imunizadas e desafiadas com taquizoítos.
NIDT- Ratas não imunizadas desafiadas com taquizoítos.
I- Ratas imunizadas.
C- Controle: Ratas não imunizadas e não desafiadas.

5.2.5. Histopatologia

No experimento II, observou-se resposta semelhante ao experimento I. Contagens maiores e significativas de linfócitos foram encontradas nos grupos imunizados, desafiados com bradizoítos e oocistos. A contagem absoluta de neutrófilos e macrófagos não diferiram estatisticamente entre os grupos imunizados e não imunizados, com exceção dos grupos controles, independente do desafio (Tabela 25; Figura 31).

Tabela 25. Comparação entre as médias da contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos e macrófagos presentes no intestino delgado das ratas submetidas a diferentes protocolos de imunização e exposição, no experimento II. Botucatu, SP, 2013.

Grupos	Neutrófilos	Linfócitos	Macrófagos	Estatística	Valor de $P^{\ddagger}$
Grupo IDB	$103,70 \pm 40,57^{Aab}$	$987,04 \pm 352,01^{Aa}$	$22,22 \pm 20,29^{Ab}$	KW = 12,194	0,0022
Grupo NIDB	$55,56 \pm 34,64^{Aab}$	$498,15 \pm 96,54^{Ba}$	$18,52 \pm 22,68^{Ab}$	KW = 10,997*	0,0041
Estatística	t = 2,018; P = 0,0783	t = 2,995; P = 0,0172	U = 10,50; P = 0,7497	-	-
Grupo IDO	$70,37 \pm 8,28^{Aab}$	$659,26 \pm 141,40^{Aa}$	$11,11 \pm 10,14^{Ab}$	KW = 12,844	0,0016
Grupo NIDO	$86,87 \pm 15,55^{Aab}$	$973,27 \pm 180,98^{Ba}$	$18,52 \pm 18,52^{Ab}$	KW = 12,567*	0,0019
Estatística	U = 4,00; P = 0,0894	t = 3,057; P = 0,0156	U = 9,50; P = 0,5969	-	-
Grupo IDT	$28,92 \pm 9,26^{Aab}$	$759,49 \pm 225,57^{Aa}$	$14,82 \pm 15,50^{Ab}$	KW = 10,672*	0,0048
Grupo NIDT	$25,93 \pm 10,14^{Aab}$	$520,37 \pm 107,27^{Aa}$	$14,82 \pm 15,50^{Ab}$	KW = 10,446	0,0054
Estatística	U = 9,50; P = 0,5957	t = 2,141; P = 0,0647	t = 0,000; P > 0,9999	-	-
Grupo I	$83,46 \pm 26,08^{Aab}$	$864,82 \pm 117,23^{Aa}$	$14,82 \pm 15,50^{Ab}$	KW = 12,567*	0,0019
Grupo C	$33,33 \pm 27,47^{Bab}$	$468,52 \pm 65,01^{Ba}$	$7,41 \pm 10,14^{Ab}$	KW = 10,948	0,0042
Estatística	t = 2,959; P = 0,0182	U = 0,00; P = 0,0079	U = 9,00; P = 0,5211	-	-

Legenda: KW: Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; U: Teste não paramétrico de Mann-Whitney; t: teste t de Student não pareado; * Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis adotado devido aos dados apresentarem distribuição normal porém os desvios padrões apresentaram diferença significativa ao teste de homogeneidade de variância (Teste de Bartlett); ‡ Valor de P para um nível de significância de 5%.

Estatística: valores de P menores que 0,05 indicam diferenças significativas entre as contagens de células específicas no momento estudado ou entre os grupos – valores de médias seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos. Letras maiúsculas avaliam na vertical as diferenças entre os grupos para cada tipo específico de célula (teste t de Student não pareado ou teste não paramétrico de Mann-Whitney). Letras minúsculas avaliam na horizontal as diferenças entre as células específicas para um mesmo grupo (Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

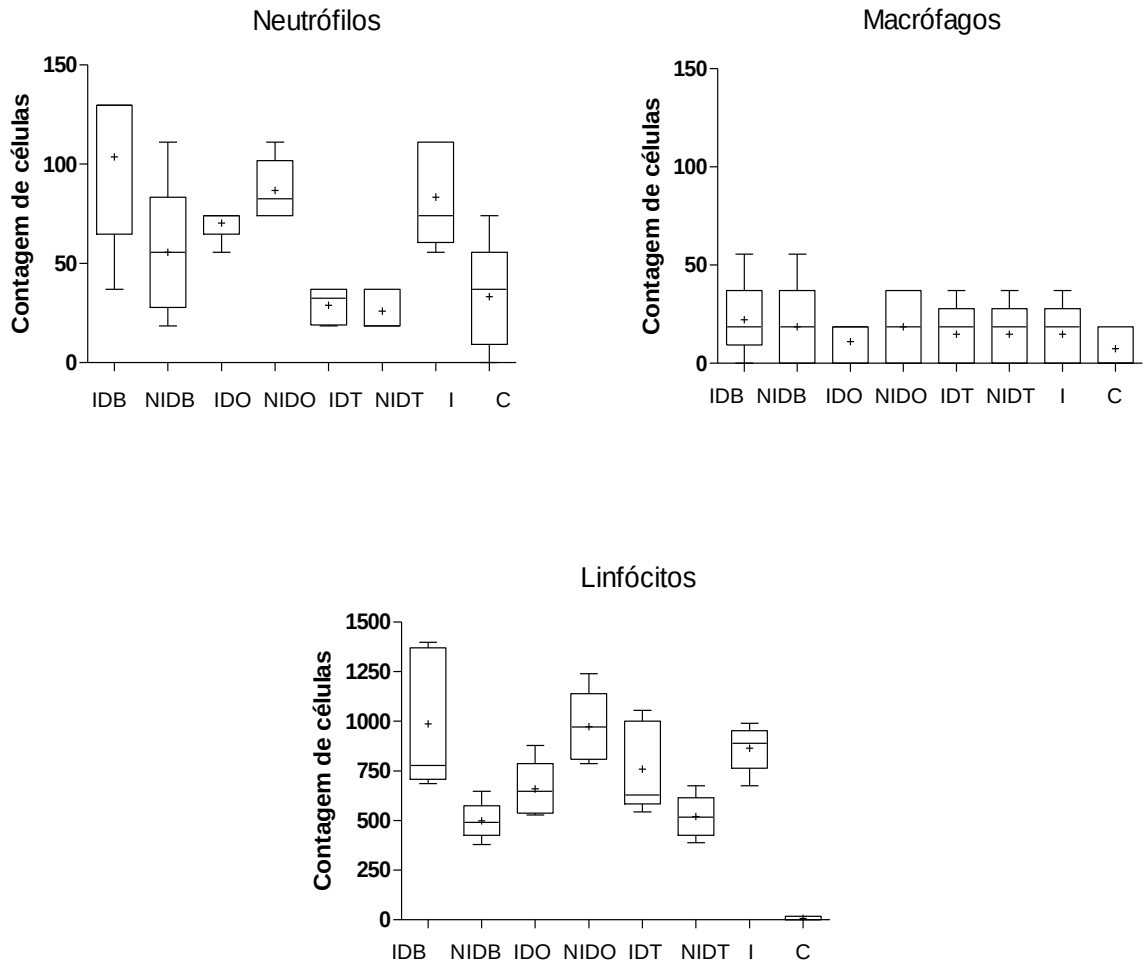


Figura 31. Mediana e variação interquartil ( ), limites mínimo e máximo ( ), e média (+) da contagem de células do sistema imune no intestino delgado dos animais do experimento II, de acordo com os grupos estudados. Botucatu, SP, 2013.

6. DISCUSSÃO

6.1. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A detecção do parasito em órgãos de animais infectados, seja por bioprova ou pela PCR convencional, é vastamente observada na literatura (ZENNER et al., 1993; FREYRE et al., 2004; FREYRE et al., 2006; FREYRE et al., 2008). Porém não há literatura disponível para confronto de dados em relação à carga parasitária em tecidos de animais previamente imunizados e em condição de prenhez. Interessa particularmente a este estudo, se a imunidade gerada pela vacina seria útil apenas para manter o parasito quiescente ou seria capaz de reduzi-lo ou até mesmo eliminá-lo.

Quanto à análise da PCR convencional no experimento I, os grupos imunizados IDB e IDO apresentaram na maioria dos órgãos analisados, frequências menores de parasitismo, quando comparados a grupos desafiados, sem vacina. Esta constatação ficou mais evidente no tecido cerebral, em que ocorreu 50% na positividade em ratas não imunizadas. Nos grupos desafiados com taquizoítos, praticamente não houve positividade nos tecidos analisados, com exceção da porção muscular de dorso direito em ratas não imunizadas (NIDB), fato justificável pela característica acistogênica da cepa RH. No experimento II, os grupos imunizados IDB e IDO também apresentaram menor frequência relativa de amostras positivas.

Nos experimentos I e II verificou-se uma maior detecção do DNA do parasito nos grupos de animais desafiados com oocistos, que apesar de pertencer a mesma cepa dos grupos desafiados com bradizoítos, este estágio evolutivo do parasito apresenta maior disponibilidade de formas infectantes, uma vez que cada oocisto contem oito esporozoítos.

Observou-se que na inoculação com taquizoítos o parasito foi mais frequentemente detectado em musculatura esquelética em comparação aos demais tecidos analisados. Comparando-se às demais formas infectantes, nos desafios por taquizoítos a carga parasitária detectada nos tecidos foi notadamente inferior, nos dois experimentos.

A quantidade de DNA de amostras de baço, pulmão e fígado foram insuficientes para detecção pela PCR convencional, pois se encontravam

abaixo do limite mínimo de detecção pré-estabelecido pela técnica, mas que foram possíveis de determinar pela PCR em tempo real.

Para essa variável analisada, observou-se que nos dois experimentos, a imunização mostrou efeito favorável na redução da positividade pela PCR na maioria dos tecidos analisados, independentemente do desafio.

No experimento I, a imunização exerceu efeito favorável na carga parasitária de tecido cerebral, nos grupos de ratas submetidas aos desafios por bradizoítos, oocistos e taquizoítos, em relação aos grupos submetidos aos mesmos desafios, sem vacinação. No grupo IDO, além do tecido cerebral, ocorreu redução significativa no tecido cardíaco e de MAD. No grupo IDT, reduções significativas no DNA parasitário foram verificadas em MAD e DE, além de cérebro.

No experimento II, a vacina gerou efeito benéfico nos grupos desafiados por oocistos (IDO) e bradizoítos (IDB), notadamente em tecido muscular. Em tecido hepático a redução na carga parasitária ficou evidente no grupo IDO. No desafio por taquizoítos, a vacina resultou em benefícios em relação às não imunizadas quanto à quantificação do DNA do parasito em musculatura (MAE).

Quanto à distribuição do parasito pelos tecidos, nos grupos desafiados por bradizoítos e oocistos foram mais frequentemente encontrados em cérebro e musculatura, nos grupos desafiados por taquizoítos principalmente em musculatura e coração (Figura 17). Em consonância ao registrado na literatura, onde o desenvolvimento do parasito é mais frequente em tecido nervoso, muscular e cardíaco, embora também possa se desenvolver em órgãos viscerais como pulmão e fígado (DUBEY et al., 1998).

Na determinação da carga parasitária pela PCR quantitativa, a vacina promoveu efeito benéfico na diminuição do número de parasitos, em ambos os experimentos, nos desafios com bradizoítos e oocistos. Quanto ao desafio com taquizoítos, a redução da intensidade de infecção só foi verificada no experimento I, enquanto que no experimento II, estatisticamente não se observou este efeito. Embora, no geral, o efeito da imunização na redução da carga parasitária foi favorável, porém sua utilização deve ser melhor avaliada, pois no estudo ocorreram exceções que devem ser consideradas, como observado em musculatura de DE no desafio por oocistos (experimento I) e no

desafio por taquizoítos em MAE e DE (experimento II), em que a carga parasitária do grupo imunizado foi contrariamente maior.

Os resultados indicam que a imunização com vacina irradiada de taquizoítos de *T. gondii* promoveu redução da carga parasitária na maioria dos órgãos analisados, no entanto, não impediu completamente o estabelecimento da infecção com o parasito. Porém, se a vacinação promove redução do parasitismo isso pode significar que uma carga parasitária menor poderia minimizar os sinais clínicos em animais infectados ou reduzir a via epidemiológica de maior importância para infecção humana, pela redução na quantidade de parasitos na musculatura e órgãos de animais produtores de carne.

A ocorrência de abortos não foi observada em nenhum dos grupos do experimento I, e a mediana de carga parasitária nos neonatos não diferiu estatisticamente entre os grupos imunizados e não imunizados, porém a taxa de fecundidade nos grupos desafiados sem vacinação foi inferior aos grupos vacinados, o que implica que possa ter ocorrido reabsorção embrionária, já que a infecção foi no início da prenhez, pois a média de filhotes encontrada nas ratas imunizadas foi superior ao verificado nas ratas não imunizadas. Além disso, a porcentagem de neonatos infectados foi superior nos grupos não imunizados. A imunização com vacina irradiada de taquizoítos de *T. gondii*, mostrou efeito favorável quanto à taxa de fecundidade e tamanho da ninhada.

Diferentemente do observado no experimento I, a imunização não promoveu benefícios nos índices reprodutivos avaliados, pois tanto a taxa de fecundidade e de nascidos não foi favorecida pela imunização. Porém como efeito favorável da imunização destacou-se a diminuição na porcentagem de infectados e da carga parasitária nos filhotes, em todos os desafios, o que permite supor que animais infectados com menor carga parasitária são mais resistentes ao desenvolvimento da doença.

Resultados positivos quanto a vacinação foram descritos por Zenner et al. (1993) verificando-se que em ratas imunizadas dois meses antes da gestação com cepa RH de *T. gondii*, não apresentaram transmissão materno-fetal pela bioprova, mesmo após o desafio durante o período gestacional com a cepa RH. Em 1999, Zenner et al., em busca de possíveis candidatos vacinais contra *T. gondii*, verificaram pelo bioensaio, que em ratas imunizadas e

desafiadas com a mesma cepa houve proteção contra a transmissão congênita.

Omata e Suziki (1975) verificaram que não houve casos de toxoplasmose congênita em tecidos de neonatos filhos de ratas cronicamente infectadas. Porém, quando a primoinfecção ocorreu durante a gestação a transmissão ao feto foi detectada pela bioprova em 100% dos casos.

Freyre et al. (2008) verificaram que ratas gestantes primoinfectadas com 10^4 bradizoítos e 10^2 oocistos da cepa Prugniaud a taxa de transmissão congênita foi de 50% pelo bioensaio.

Freyre et al. (2008) verificaram que em ratas imunizadas com oocistos da cepa ME49 não houve colonização cerebral e muscular de *T. gondii* após desafio com cepa M7741, enquanto que em ratas não imunizadas a colonização foi de 100%. Posteriormente, tecido cerebral e muscular das ratas foram bioensaiados em camundongos. Não ocorreu óbito em camundongos inoculados com homogenato de cérebro e músculo provenientes de ratas imunizadas, enquanto que nos camundongos que receberam tecidos de ratas não imunizadas verificou-se a ocorrência de óbitos.

Freyre et al. (2006) verificaram que em ninhadas de neonatos de ratas imunizadas com cistos e desafiadas com cepa homóloga a proteção foi de 100%, enquanto que em ratas que receberam desafio heterólogo ao da imunização a proteção foi de 12,1%. Constatou-se também que quando o desafio é realizado com a mesma cepa, mas com forma infectante diferente, a proteção também não é completa. A imunização com cepas homólogas, porém em diferentes formas infectantes resultam em diferentes taxas de proteção congênita. Em ratas desafiadas com oocistos da cepa M7741 e previamente imunizadas com oocistos da cepa ME49 obteve-se 43% de taxa de proteção, porém quando imunizadas com a mesma cepa, na forma cística, as taxas de proteção alcançaram 80-100% (FREYRE et al., 2006).

Imunização com fragmentos SAG1 e SAG2 incorporado a ISCOMS (Immune Stimulating Complexes) confere proteção em camundongos quando desafiados com taquizoítos e bradizoítos, mas não protege contra o desafio com oocistos. Estes achados implicam que para interromper o ciclo biológico do parasito em seus diferentes hospedeiros, é necessário imunizar cada

hospedeiro com antígenos que promovam a proteção contra a forma infectante mais frequente de ocorrer naquela espécie (JENKINS, 2001).

A cepa RH não desenvolveu formas císticas no tecido cerebral das ratas infectadas, fato também observado por Freyre et al. (2004). Não houve persistência do parasito pela inoculação intraperitoneal com $5x10^4$ taquizóitos desta cepa, após dois meses de infecção. Porém, a cepa RH quando inoculada subcutaneamente, desenvolveu formas císticas do parasito no cérebro (FREYRE et al., 2004).

Um estudo utilizando a PCR quantitativa na avaliação da transmissão materno-fetal em *Cavia aperea* revelou que cepas cistogênicas de *T. gondii* promoveram uma maior carga parasitária nos tecidos dos neonatos e a severidade das manifestações clínicas da toxoplasmose foi associada à alta carga parasitária no fígado (FLORI et al., 2002). Porém, o estudo não avaliou animais imunizados, mas sim o efeito quantitativo na infecção congênita.

Quanto a fase de infecção na gestação, Wang et al. (2011) verificaram que a quantidade de cistos em camundongos recém-nascidos foi maior quando a infecção ocorreu nas fases inicias e intermediárias da prenhez. A taxa de sobrevivência da prole nascida a partir do grupo de camundongas infectadas com *T. gondii* no estágio anterior de penhez foi de apenas cerca de 40%, significativamente inferior aos grupos infectados na fase final (90%) e controles (100%).

O efeito protetor da vacinação contra a toxoplasmose congênita utilizando a porção recombinante SAG1 de *T. gondii* foi verificado por Haumont et al., (2000), sendo que a presença do parasito no feto foi determinada pela nested-PCR que revelou ausência de parasitismo em 66-88% dos fetos, de mães imunizadas desafiadas com cepa virulenta C56.

Quanto ao tecido muscular, Freyre et al. (2008) constataram que ratas imunizadas com cepa a ME49 de *T. gondii* não desenvolveram cistos musculares quando posteriormente desafiadas com cepa M7741.

Quanto ao encontro do agente pelo leite, houve detecção pela qPCR em amostras de ratas pertencentes tanto nos grupos imunizados quanto nos grupos não imunizados, em todos os momentos de colheitas, sendo possível sua detecção após 21 dias do desafio, na primeira colheita de leite, até 42 dias

pós-desafio e na última colheita de leite, mesmo após o desenvolvimento de resposta imune humoral específica.

Costa e Langoni (2010) verificaram a eliminação de *T. gondii* pelo leite de ratas cronificadas bem como a transmissão galactogênica para os neonatos, já que tanto o leite materno como amostras de tecidos dos neonatos, mostraram-se positivas na PCR, contrariando a hipótese de que o agente somente pode ser eliminado pelo leite de animais com infecção aguda.

Pettersen (1984) demonstrou experimentalmente que camundongos lactantes cronicamente infectados excretaram cistos pelo leite, mostrando que, apesar da transmissão ser comumente atribuída à eliminação de taquizoítos, também pode ocorrer pela excreção de cistos teciduais. Segundo Hiramoto (2001), a contaminação do leite pelo parasito pode ocorrer de maneira endógena, na glândula mamária, quando células da glândula mamária estiverem abrigando cistos de *T. gondii*. Durante a lactação estes cistos revestidos pela membrana celular do hospedeiro podem ser secretados por exocitose, assim como ocorre fisiologicamente, com os glóbulos de gordura presentes no leite liberados para o lúmen pela exocitose das células para produção de leite (DEYRUP-OLSEN e LUCHTEL, 1998).

A presença do DNA do parasito também foi detectada no leite de ovelhas com perfil sorológico de cronicidade da infecção. O escape de taquizoítos na reativação da infecção pode ter favorecido a detecção molecular pela PCR em alguns momentos da infecção. Porém, na hipótese de reagudização, esta não foi acompanhada por elevação nos títulos de anticorpos obtidos pela MAD-AM ou RIFI-IgM, permanecendo a evidência sorológica de cronicidade da infecção (CAMOSSI et al., 2010).

Levanta-se a possibilidade que a queda fisiológica da imunidade no periparto também pode ser passível de promover a recrudescência de bradizoítos teciduais de *T. gondii*, tornando-os novamente circulantes, podendo ser eliminados no leite.

Além de animais de laboratório, já foi demonstrada, experimentalmente, a presença do agente no leite de várias espécies como em bovinos, caprinos, ovinos, camelos, gatos e cães (CHIARI e NEVES, 1984; TENTER et al., 2000; POWELL et al., 2001; BRESCIANI et al., 2001; ISHAG et al., 2006; CAMOSSI et al., 2011).

6.2. Sorologia

Na exposição ao antígeno nas primeiras semanas da primoinfecção, são produzidos anticorpos IgM, IgA e IgG, e os taquizoítos extracelulares são lisados por anticorpos específicos quando esses estão combinados com o complemento. Na infecção do hospedeiro as IgM e IgA aparecem primeiro, podendo ser detectadas pelas reações sorológicas dentro de sete a 12 dias após a infecção aguda por *T. gondii*. Na evolução da infecção configura-se um perfil sorológico de transição, com níveis elevados de IgG, de afinidade crescente pelo antígeno e com IgM ocasionalmente presentes com baixos títulos. Progressivamente, há alteração para um perfil de infecção latente ou crônica, que em geral se mantém por toda a vida, com níveis baixos de IgG e ausência de outros anticorpos de outros isotipos, ainda que ocasionalmente se encontrem resíduos de IgM. A transição do perfil sorológico de infecção recente para o perfil de infecção latente é mais ou menos lenta, em semanas ou meses, dependendo do estado imunitário do hospedeiro (CAMARGO et al., 1977).

Em animais vacinados, a imunidade humoral resulta em dois tipos predominantes de célula: plasmócitos e células B de memória. Enquanto que os plasmócitos mantém uma produção basal de anticorpos, as células B proliferam em resposta a estimulação antigênica. A maturação da afinidade de anticorpos ocorre durante a resposta primária com produção inicial de anticorpos de baixa afinidade, que são substituídos ao longo da resposta imune por anticorpos específicos de alta afinidade, importantes na proteção contra a reinfecção e na imunidade do hospedeiro, portanto, estes anticorpos podem ser bons marcadores de proteção (AMANNA e SLIFKA, 2010).

Na reexposição ao antígeno (desafio), o animal vacinado produz uma resposta imune secundária ou resposta imune anamnestésica, obtendo-se níveis mais elevados de anticorpos produzidos pelas células B de memória, fato que no estudo do experimento I foi verificado na produção de IgA nos grupos imunizados e desafiados por oocistos e taquizoítos (colheita 8) e por bradizoítos (colheita 9), e na produção de IgG em todos os grupos imunizados e posteriormente desafiados com *T. gondii.* No experimento II, embora observado uma tendência de níveis de anticorpos mais elevados em ratas

previamente imunizadas, esta foi verificada estatisticamente somente no desafio por oocistos nos níveis de IgG e IgM.

Resultados semelhantes foram verificados por Zorgi et al. (2011), constatando que a resposta humoral para IgG produzida por camundongos imunizados com taquizoítos irradiados foi maior quando imunizados pela via intraperitoneal em comparação com camundongos imunizados pela via oral. Para IgA não houve diferença na produção de anticorpos, independente da via de imunização. No presente estudo, verificou-se que a presença de anticorpos específicos e células de memória são importantes para prevenir a manifestação doença, mas não a infecção.

6.3. Contagem de cistos cerebrais

Nos grupos de ratas desafiadas com taquizoítos, não houve formação de cistos teciduais de acordo com a contagem microscópica, devido a própria característica da cepa, acistogênica, e porque não houve tempo suficiente entre a infecção até o fim do experimento para formação cística no cérebro.

Freyre et al. (2006) verificaram a proteção induzida por taquizoítos e bradizoítos da cepa ME49, esterilizados por radiação gama de cobalto contra a formação de cistos teciduais em camundongos. Após o desafio com 20 oocistos de *T. gondii* da mesma cepa, 12% dos camundongos imunizados com taquizoítos irradiados apresentaram cistos cerebrais, enquanto que em camundongos imunizados contra bradizoítos irradiados, a taxa foi de 24% e no grupo controle foi de 50%.

Bottin et al. (2009) verificaram contagem de cistos teciduais no cérebro de camundongos infectados com cepa ME49, pela via oral uma produção mediana de 600 cistos, enquanto que pela via subcutânea a produção foi de 140 cistos cerebrais. Resultados semelhantes foram encontrados por Dubey et al. (1997), onde camundongos infectados com as mesmas concentrações de inóculo da cepa ME49 revelaram maior formação de cistos cerebrais quando inoculados pela via oral (566 a 1340) em comparação a via subcutânea (340 a 740).

No estudo de Zorgi et al. (2011) e Galisteo Júnior et al. (2008), utilizando taquizoítos irradiados da cepa RH, verificaram que camundongos imunizados

apresentaram um acentuado decréscimo na contagem de cistos cerebrais comparado a camundongos infectados sem imunização.

Camundongos previamente imunizados com diferentes imunógenos de *T. gondii* como proteínas antigênicas do micronema (BEGHETTO et al., 2005), segmentos do RNA (DIMIER-POISSON et al., 2005), antígeno lisado deste agente (El-MALKY et al., 2005), e pela cepa Mic1-3KO (ISMAEL et al., 2006), também apresentaram redução parcial na contagem de cistos cerebrais.

6.4. Leucograma

Leucócitos:

Os resultados encontrados foram confrontados com os parâmetros de normalidade para a espécie. Segundo os valores de referências propostos por Cubas et al (1997) para leucócitos é de 4.0-17.0 (10^3/mL), neutrófilos 9.0-50.0 (%), linfócitos (50-85%) e monócitos (0-5%). Ressalta-se que o leucograma não é um exame específico e conclusivo para indicar a infecção pelo *T.gondii*, embora possam ocorrer alterações no leucograma com variações na contagem dos tipos celulares.

Na contagem total de leucócitos, desde a primeira até a última colheita, os parâmetros mantiveram-se dentro dos valores normais para a espécie com leves flutuações. A flutuação na contagem de linfócitos foi esperada após a imunização, pois estas células respondem de maneira específica aos antígenos, seja pela produção de anticorpos ou por citotoxidade. Pelo reconhecimento do antígeno, os linfócitos específicos são ativados, proliferam e sofrem modificações estruturais que possibilitam efetuar a resposta imune (HOKAMA e MACHADO, 1997).

O controle da infecção por *T. gondii* é mediado por células, onde a ativação dessa defesa está relacionada aos tipos celulares especializados que interagem entre si por meio de citocinas e expressão de antígenos de superfície. Durante a infecção diferentes perfis de citocinas são observados, resultando em respostas efetoras distintas, denominadas do tipo Th1 e Th2. A primeira envolve células T helper e citotóxica, mediadas por IFN-γ, IL-2 e TNF-α, produzidas nas infecções intracelulares, enquanto que a resposta Th2 são

dirigidas a infecções extracelulares e mediadas por IL-4, IL-5,IL-10, IL-13 (HIRAMOTO et al., 2002; GALISTEO JÚNIOR, 2008).

Característica da infecção por *T. gondii* é o desenvolvimento de resposta imune que propicia a proteção do hospedeiro, evitando o rápido desenvolvimento de taquizoítos e, consequentemente, prevenindo a infecção severa. Dessa forma, a resposta imune para *T. gondii* é normalmente branda, pois não desencadeia mudanças imunopatológicas significantes em indivíduos normais. A infecção pelo parasito normalmente não acarreta grandes modificações leucocitárias, afinal seu curso é normalmente assintomático ou resulta em sintomas leves, como febre e linfadenopatia (COSTA-SILVA e PEREIRA CHIOCOLLA, 2010).

Era esperado que em resposta ao desafio, houvesse um aumento na contagem global de leucócitos, entretanto, o efeito imunomodulador da gestação pode ter sobreposto ao efeito do desafio, fato registrado na literatura (PFAFF e CANDOLFI, 2008).

O período gestacional ocasiona uma condição imunológica única, aumentando a suscetibilidade a infecções devido à modulação de alguns mecanismos imunes. Essas alterações ocorrem durante a gravidez para manter o sistema imunológico materno tolerante aos antígenos paternos de histocompatibilidade expressos pelo feto. A gestação é caracterizada por supressão do sistema imunológico adaptativo com diminuição dos linfócitos (MOR e CARDENAS, 2010).

A progesterona, hormônio responsável pela manutenção da gestação, é considerado um imunossupressor natural (MOR e CARDENAS, 2010), o antígeno HLA-G do MHC (major histocompatibility complex) da classe I, expresso nas células trofoblásticas, inibe a função das células NK, linfócitos T citotóxicos e maturação das células dendríticas, desempenhando uma função importante na tolerância fetal às células maternas**,** de modo a reduzir a atividade inflamatória. Há diminuição de células Th1, em favor das células imunes menos lesivas, Th2. Esta transformação do predomínio da resposta imune Th1 para Th2 é caracterizada pela diminuição da produção de citocinas tipo 1 (IL-2 e INF-γ) e pelo aumento das citocinas tipo 2 (IL-4). Ocorre também menor produção de IFN-γ e TNF-α pela ação de progesterona e prostaglandina E. A enzima IDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase) uterina limita ação dos

linfócitos T maternos, altera o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, que serve para favorecer a manutenção da gestação, porém facilita o desenvolvimento de infecções. O IFN-γ, importante na contenção da multiplicação do parasito, apresenta efeitos deletérios para o feto, por isso tem sua produção suprimida (PFAFF e CANDOLFI, 2008).

A contagem de leucócitos do estudo não representou um bom indicador de infecção por *T. gondii*, pois outros fatores podem ter influenciado a contagem de células sanguíneas como, por exemplo, gestação, estresse de manipulação e confinamento dos animais, injúria e reparação tecidual da colheita intracardíaca, contato com outros antígenos, embora livres de patógenos específicos, os animais do experimento não eram axênicos, possivelmente houve envolvimento das células sanguíneas nos processos imunológicos contra outros antígenos.

Linfócitos:

Após a imunização é esperado o aumento do número de linfócitos, pois a resposta mediada pelos linfócitos T é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares, o que é o caso de *T. gondii,* existindo uma associação entre as contagens aumentadas de linfócitos T CD8+ e a ocorrência dos sintomas clínicos no curso da infecção toxoplásmica adquirida. As células T exercem sua função por meio da citotoxicidade mediada por células CD8+ ou pela secreção de citocinas restringindo a disseminação da parasitemia por *T. gondii*, além de ativar macrófagos para destruir agentes intracelulares (MACHADO et al., 2004; FOUNTOURA e BECK, 2011).

No presente estudo não se encontrou um padrão uniforme na resposta dos grupos as demais imunizações, revelando que não há evidência laboratorial diagnóstica específica para a toxoplasmose quanto à análise do leucograma.

Monócitos:

Os monócitos são importantes no controle imune de *T. gondii*, pela potente atividade microbicida contra micro-organismos intracelulares, além de estarem envolvidos na resistência adaptativa contra o agente pela apresentação de antígeno (DENKERS et al., 2012). Utilizando-se o rato como

modelo animal, verificou-se que a resistência a toxoplasmose aguda está associada à supressão da replicação do parasito por meio de uma variedade de mecanismos IFN-γ dependentes, com produção antecipada de IL-12 produzida pelos macrófagos (DENKERS et al., 2012).

Neutrófilos:

Em um primeiro momento os neutrófilos são mobilizados ao local de infecção, onde exercem fagocitose com liberação de grânulos antimicrobianos e sofrem posterior apoptose. Também participam da formação da imunidade ao liberarem citocinas moduladoras e quimiocinas ativando células dendríticas para destruição do parasito (DENKERS et al., 2012).

A toxoplasmose aguda pela cepa RH induz a granulopoiese lançando-as em diferentes estágios de maturação e diferenciação, primeiramente por meio de neutrófilos e monócitos (PETAKOV et al.,2002).

Por fim, é pelo desenvolvimento da imunidade humoral e celular que ocorre a restrição da ação patogênica do parasito, assumindo assim a fase crônica, latente e permanente da infecção. Estima-se que a persistência dos cistos mantenha uma imunidade durável, não esterilizante, mas protetora de uma nova infecção (DUBEY et al., 1998). Nesse caso, o sucesso do parasitismo crônico está relacionado ao controle parasitário da resposta inflamatória, o que determina a permanência silenciosa do parasito no organismo hospedeiro (FERNANDES et al., 2005). Se um estado de imunodeficiência se desenvolve, ou até mesmo em condição de prenhez, os bradizoítos podem ser ativados resultando em nova disseminação e multiplicação do parasito podendo a partir desta reagudização resultar em doença clínica.

6.5. Histologia

Em animais inoculados, pela via oral, as formas infectantes de *T. gondii* liberadas no lúmen do intestino delgado invadem enterócitos ou linfócitos intraepiteliais e alcançam a lâmina própria, onde se diferenciam em taquizoítos e invadem células presentes neste local. Quando taquizoítos interagem com mastócitos presentes na lâmina própria, desencadeia uma cascata de eventos imunológicos envolvendo os componentes da resposta imune inata e

adaptativa. Os neutrófilos, macrófagos e linfócitos são atraídos por um processo de quimiotaxia (FERREIRA et al., 2004) e também por moléculas secretadas por enterócitos presentes na região basolateral das criptas intestinais (KASPER et al., 2004). Este processo visa conter o parasito, já que se sabe que a depleção de neutrófilos em camundongos diminui a resistência do organismo à infecção causada por *T. gondii* (BLISS et al., 2001). A liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células de defesa, como IFN-γ, TNF-α e óxido nítrico podem causar danos epiteliais ao intestino delgado (SCHREINER e LIESENFELD, 2009). Em camundongos infectados por *T. gondii*, observam-se áreas descontínuas de inflamação intestinal, com infiltrados de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares na lamina própria, submucosa e camadas musculares (REMINGTON, 1974; GALISTEO JÚNIOR, 2008).

É esperado que a vacinação promova uma resposta imunológica adaptativa a partir do aperfeiçoamento dos mecanismos de resposta imune inata, pois os animais entraram previamente em contato com antígenos do parasito e já montaram uma resposta específica com a presença de células de memória contra o agente. A indução prévia da resposta imune pode auxiliar o hospedeiro quando posteriormente desafiado pelo patógeno vivo virulento (INNES et al., 2011), explicando possivelmente o aumento significativo de linfócitos no intestino das ratas previamente imunizadas, nos grupos desafiados por bradizoítos e oocistos do experimento II e por bradizoítos experimento I. A capacidade das vacinas em estimular os linfócitos T e B de memória constitui um importante mecanismo em gerar imunidade de longa duração.

Na contagem de macrófagos não foi demonstrada diferença entre os grupos que apresentaram contagens semelhantes, demonstrando possivelmente que sua ação deve ser mais efetiva durante a infecção ativa, pela fagocitose. Quanto aos neutrófilos também é esperada uma participação mais efetiva em momentos próximos ao desafio. No estudo só foi verificada diferença na contagem desta célula no desafio por bradizoítos (experimento I).

Na análise do exame histopatológico não foi observada a presença de cistos teciduais no intestino delgado que, segundo Dubey (1994), são achados raros. No presente estudo, a necropsia foi realizada 21 dias após a infecção, no experimento I, 42 dias pós-infecção, no experimento II. Cabe lembrar que a

renovação (turnover) das células epiteliais do intestino (proliferação, migração, diferenciação e apoptose) são processos altamente dinâmicos e seus resultados seriam mais representativos se a colheita deste órgão fosse realizada após a infecção. O acesso ao órgão só foi possível com a eutanásia das ratas, ou seja, no momento final do experimento. Este aspecto poderia ser melhor avaliado em momentos próximos ao desafio e, para tanto, novos estudos são necessários buscando melhor entendimento desta resposta.

7. CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo conclui-se que:

No experimento I:

- A imunização causou diminuição da carga parasitária em tecido cerebral, em todos os desafios, em musculatura esquelética no desafio com oocistos (MAD) e taquizoítos (MAD e DE) e em tecido cardíaco no desafio com oocistos.
- A imunização não promoveu redução na carga parasitária de neonatos, independente do desafio, porém favoreceu os índices reprodutivos como taxa de fecundidade e tamanho da ninhada.
- A imunização causou diminuição na contagem média de cistos cerebrais no desafio com bradizoítos e oocistos.
- A imunização teve influência sobre a imunidade celular intestinal na contagem de linfócitos e neutrófilos no desafio com bradizoítos.
- O leucograma não representou um bom indicador de imunização e infecção contra o *T. gondii*.
- A imunização promoveu aumento dos níveis séricos de anticorpos IgG e IgA em todos os desafios.

No experimento II:

- A imunização reduziu a carga parasitária tecidual em musculatura esquelética no desafio com bradizoítos (MAD, MPE, MPD, DE), oocistos (MAE, MAD, MPD, DE, DD) e taquizoítos (MAE), bem como em fígado, no desafio com bradizoítos.
- A imunização promoveu redução na carga parasitária dos filhotes, porém não influenciou na taxa de fecundidade.
- A detecção do DNA do parasito no leite foi verificada em todos os grupos e a imunização não interferiu na quantificação de parasitos.
- A imunização causou diminuição na contagem média de cistos cerebrais no desafio por bradizoítos e oocistos.
- A imunização teve influência sobre a imunidade celular intestinal na contagem de linfócitos no desafio por bradizoítos e oocistos.
- A imunização não promoveu impacto nas variáveis hematológicas, que permaneceu dentro dos parâmetros de normalidade durante imunização e desafio.
- A imunização promoveu aumento dos níveis séricos de anticorpos IgG e IgM apenas no desafio por oocistos.

CONCLUSÃO FINAL

- A vacina promoveu redução do parasitismo em cérebro e musculatura, porém não houve eliminação do parasito. Em doses menores de exposição, contra as diferentes formas infectantes do agente, houve redução da carga parasitária em cérebro e musculatura, enquanto que em doses maiores de desafio a diferença foi verificada em musculatura.

- Em doses menores de desafio, a vacina não promoveu redução da carga parasitária dos neonatos, porém favoreceu tamanho da ninhada e taxa de concepção. Frente a dose maior de infecção, verificou-se redução na carga parasitária nos neonatos de ratas imunizadas, sem diferença no tamanho da ninhada e taxa de fecundidade.

- Ratas imunizadas apresentaram contagem inferiores de cistos cerebrais, no desafio por oocistos e bradizoítos (experimento 1) e no desafio por oocistos (experimento 2).

- A imunização promoveu aumento da contagem de linfócitos no intestino delgado, no desafio por bradizoítos, em ambos experimentos. Contagem superiores de linfócitos foram verificadas no desafio por oocistos, no experimento 2.

- Níveis séricos de Imunoglobulina G foram verificados em ratas imunizadas, independente da dose de desafio.

- Leucograma não representou bom indicador de imunização e infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALEXANDER, J.; JEBBARI, H.; BLUETHMANN, H.; SATOSKAR, A.; ROBERTS, C.W. Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design. *Current Topics Microbiology Immunology*, v.219, p.183-195, 1996.

AMANNA, I.J.; SLIFKA, M.K. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunology Reviews*, v.236, p125–38, 2010.

AMENDOEIRA, M.R.R.; CAMILLO-COURA, L.F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Scientia Medica*, v.20, n.1, p.113-119, 2010.

ARAÚJO, F. G. Depletion of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infection and Immunity*, v.59, n.5, p.1614-1619, 1991.

ARAÚJO, W.N.; Da SILVA, A.V.; LANGONI, L. Toxoplasmose: uma zoonose-realidade e riscos. *Revista Cães e gatos*, n.79, p.22-27, 1998.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; JONES, J.; SILVA, J.A.; ALVES, C.C.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D.G. Highly endemic waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.1, p.55-62, 2003.

BARIL, L.; ANCELLE, T.; GOULET, V.; THULLIEZ, P.; TIRARD-FLEURY, V.; CARME, B. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case control study in France. *Scandinavan Journal of Infectious Diseases*, v.31, p.305-309, 1999.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology*, v.11, p.426-430, 2003.

BEGHETTO, E.; NIELSEN, H.V.; DEL PORTO, P.; BUFFOLANO, W.; GUGLIETTA, S.; FELICI, F.; PETERSEN, E.; GARGANO, N. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. *Journal of Infectious Diseases*, v.191, p.637– 645, 2005.

*ABNT

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. Patologia clínica veterinária. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-34.

BLISS, S.K.; GAVRILESCU, L.C.; ALCARAZ, A. et al. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired imunity and lethal systemic pathology. *Infection and Immunity.*, v.69, p.4898-4905, 2001.

BOBIĆ, B.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; ŠIBALIĆ, D.; JEVREMOVIC, I.; MARINKOVIC, J.; NIKOLIC, A.; VUKOVIC, D. Epidemiological relationship between human *Toxoplasma* infection and cats in Belgrade. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.46, p.155-160, 1996.

BÓIA, M.N.; COSTA, F.A.C.; SODRÉ, F.C.; PINTO, G.M.T.; AMENDOEIRA, M.R.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among Indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v.50, p.17-20, 2008.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K. da; BORTOLIERO, A.L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30, n.1, p.21-25, 1997.

BOOTH, K.S.; JAMES, E.R.; POPIEL, I. Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Criobiology, v.33, p.330-337, 1996.

BOTTIN, J.M.P.; BASTOS JÚNIOR, E.A.; LUCAS, T.M.; ZAMPROGNA, T.O.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.; DA SILVA, A.V. Comparasion of tissue cysts formation, organ weight gain and kinects of antibodies in Swiss mice infected with *Toxoplasma gondii*. Veterinária e Zootecnia, v.16, p.519-527, 2009.

BOUT, D.T., MEVELEC, M.N., VEGLE- ROUSSEL, F.V., DIMIER- POISSON, I.D., LEBRUN, M. Prospects for a human toxoplasmosis vaccine. *Current Drug Targets*, v.2, p 227–234,2002.

BRESCIANI, K.D.S.; TONIOLLO, G.H.; COSTA, A.J.; SABATINI, G.A.; MORAES, F.R. Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. *Ciência Rural*, v.31, n.6, p.1039-1043, 2006.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. C.; KASPER, L.H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. Cellular Microbiology, v.8, n.4, p.535-544, 2006.

BUXTON, D.; INNES, E.A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, v.110, p.11-16, 1995.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Revista Brasileira de Patologia Clínica, v.10, n.3, p.87-107, 1974.

CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; ROCCA, A. Definições de perfis sorológicos na toxoplasmose. Importância diagnóstica e epidemiológica. Revista Brasileira de Patologia Clínica, v.13, p.113-127,1977.

CAMARGO, M.E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico de laboratório da toxoplasmose. Anales de La Real Academia de Medicina, Madri, v.155, n.4, p.236-239, 1995.

CAMOSSI, L.G.; GRECA-JÚNIOR, H.; CORRÊA, A.F.L.; RICHINI-PEREIRA, V.B., SILVA, R.C.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected ewe. *Veterinary Parasitology*, v.177, p.256-261, 2011.

CARDIA, D. F. F. ; ROCHA-OLIVEIRA, R.A. ; TSUNEMI, M. H. ; AMARANTE, A. F. T. Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. *Veterinary Parasitology*, v. 182, p. 248-258, 2011.

CARME, B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v.31, p.305-309, 1999.

CHAMBERLAIN, D.M.; DOCTON, F.L.; COLE, R.C. Toxoplasmosis II. Intrauterine infection in dogs, premature birth and presence of organisms in milk. *Proceedings of The* Society *for Experimental Biology and Medicine*, v.82, p.198-200, 1953.

CHANNON, J.Y.; KASPER, L.H. *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: Role of gamma interferon. *Infection and Immumity*, v.64, n.4, p.1181-9, 1996.

CHIARI, C. A.; NEVES, D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, v.79, n.3, p.337-340, 1984.

COOK, A.J.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *British Medical Journal,* v.321, p.142-147, 2000.

COSTA, V.M.; LANGONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected Wistar female rats. *Journal of Venomous Animals Toxins inclued Tropical Diseases*, v.16, n.2, p.368-374, 2010.

COSTA-SILVA, T.A.; PEREIRA-CHIOCOLLA, V.L.P. Fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*: avaliação do parasitismo sanguíneo e resposta humoral em camundongos isogênicos AS/n. *Scientia Medica*, v.20, n.1, p.88-92, 2010.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L (ed.) 2007. Tratado de animais selvagens medicina veterinária. São Paulo: Roca. Seção 5: p.432-474.

CUPPARI, A.F.; SANCHEZ, V.; LEDESMA, B.; FRANK, F.M.; GOLDMAN, A.; ANGEL, S.O.; MARTIN, V. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Vaccine,* v.*26*, p.5040-5045, 2008.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p.569-588, 1998.

DENKERS, E.Y.; KIM, L.; BUTCHER, B.A. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signaling cascades during *Toxoplasma gondii* infection*. Cellular Microbiology*, v.5, p.75-83, 2003.

DENKERS, E.Y.; SCHNEIDER, A.G.; COHEN,S.B.; BUTCHER,B.A. Phagocyte Responses to Protozoan Infection and How *Toxoplasma gondii* Meets the Challenge. *Plos Pathogens*, v.8,n.8, 2012.

DEYRUP-OLSEN e LUCHTEL, D.L., Secretion of mucous granules and other membrane bound structures: a look beyond exocytosis. *International Review of Cytology*, v.183, p.95-141, 1998.

DIMIER-POISSON, I.; ALINE, F.; BOUT, D.; MEVELEC, M.N. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by immunization with *Toxoplasma gondii* RNA. *Vaccine*, v.24, p.1705–1709, 2005.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. Veterinary Epidemiologic Research. 2.ed. VER Inc.: Charlottetown, 865p., 2010.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. *Zoonosis Update*, v. 205, n.11, p.1593-1598, 1994.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; BLIXT,J.A. Oocyst induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity and conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts*. Journal of Parasitology*, v.83, p.870-882, 1997.

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

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; PERR, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.2, p.267-299, 1998.

EDVINSSON, B.; LAPPALAINEN, M.; EVENGÅRD, B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clinical Microbiology and Infection, v.12, p.131-136, 2006.

EISSA, M.W.; EL-AZZOUNI, M.Z.; MADY, R.R.; FATHY, F.M.; BADDOUR,N.M. Initial characterization of an autoclaved Toxoplasma vaccine in mice. *Experimental Parasitology*, v.131, p. 310–316, 2012.

EL-MALKY, M.; SHAOHONG, L.; KUMAGAI, T.; YABU, Y.; NOURELDIN, M.S.; SAUDY, N.; MARUYAMA, H.; OHTA, N. Protective effect of vaccination with toxoplasma lysate antigen and CpG as an adjuvant against *Toxoplasma gondii* in susceptible C57BL/6 mice. *Microbiology and Immunology*, v.49, p.639–646, 2005.

FERNANDES, B.C.T.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; FREIRE, R.B. Dinâmica populacional de células mielóides durante o curso de inflamação crônica em camundongos C57BL/6 infectados com *Toxoplasma gondii*. *Ciência Rural*, v.35, n.6, p.1379-1385, 2005.

FERREIRA, A.M.; VITOR, R.W.; GAZZINELLI, R.T.; MELO, M.N. Genetic analysis of natural recombinant brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infectious Genetics and Evolution*, v.6, p.22-31, 2006.

FERREIRA, G.L.S.; MINEO, J.R.; OLIVEIRA, J.G. et al. *Toxoplasma gondii* and mast cell interactions in vivo and in vitro: Experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *Microbes and Infection*, v.6, p.172-181, 2004.

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali dell Istituto Superiore di Sanitá*, v.40, p.71-80, 2004.

FLORI, P.; HAFID, J.; BOURLET, T.; RABERIN, H.; GENIN, C.; SUNG, T.M. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative e qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *Journal of Medicine Microbioly*,v.51, p.871-878, 2002.

FOUNTOURA, A.M.; BECK, S.M. Anticorpos de reação cruzada durante infecção aguda por *Toxoplasma gondii*. *Sáude*, v.37, p.69-74, 2011.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; CORREA, MORGADES, D.; RODRIGUEZ, A. An investigation of sterile immunity against toxoplasmosis in rats. *Experimental Parasitology*, v.107, p. 14–19, 2004.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M. Susceptibility of artificially released zoites of *Toxoplasma gondii*, to Gammna irradiation. *Research Journal of Parasitology*, v.1, n.1, p.42-47, 2006.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA,L.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. *Experimental Parasitology*, v.112, p.8-12, 2006.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M.*Toxoplasma gondii*: Differential protection rates by two strains against cyst formation in a rat model. *Experimental Parasitology*, v.114, p. 265–270, 2006.

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: Protection against colonization of the brain and muscles in a rat model. *Experimental Parasitology*, v.119, p.252–255, 2008.

GALISTEO JÚNIOR, A.J.; HIRAMOTO, R.M.; CARMO, C.V.; ALVES, J.B.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.. 255 Gy irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii* induces intestinal immune response in C57Bl6j mice immunized by oral route. The International Nuclear Atlantic Conference (INAC), 2005.

GALISTEO JÚNIOR, A.J. *Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Imunidade humoral e celular em baço e intestino de camundongos isogênicos imunizados com taquizoítos irradiados por cobalto 60. São Paulo, 2008. 100p. Tese – IPEN –Universidade de São Paulo.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role CD4+ and CD8+ t lymphocytes in INF-gamma production and

protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *The Journal of Immunology*, v.146, p.286-292, 1991.

GAZZINELLI, R.; YUHUI, X.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, v.149, p.175-180, 1992.

HALL, S.M.; PANDIT, A.; GOLWILKAR, A.; WILLIAMS, T.S. How do jains get Toxoplasma infection*? Lancet*, v.354, p.486-487, 1999.

HAUMONT, M.; DELHAYE, L.; GARCIA, L.; JURADO, M.; MAZZU, P.; DAMINET, V.; VERLANT, V.; BOLLEN, A.; BIEMANS, R.; JACQUET, A. Protective Immunity against Congenital Toxoplasmosis with Recombinant SAG1 Protein in a Guinea Pig Model. *Infection and Immunity*, v.68, n.9, p.4948-4953, 2000.

HIRAMOTO, R.M.; MAYRBAURL-BORGES, M.; GALISTEO JR, A.J.; MEIRELES, L.R.; MACRE M.S.; ANDRADE JR, H.F. Infecciosidade de cistos de *Toxoplasma gondii* ME-49 em leite bovino e queijo caseiro. *Revista de Saúde Pública*, v.35, n.2, p.113-118, 2001.

HIRAMOTO, R.M.; GALISTEO JR, A.J.; DO NASCIMENTO, N.; ANDRADE JR, H.F. 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine*, v.20, n.16, p.2072- 2081, 2002.

HOKAMA, N.K.; MACHADO, P.E.A. Interpretação clínica do hemograma nas infecções. *The Journal of Bioscience and Medicine*, v.72, p.42-49 , 1997.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. International *Journal for Parasitology*, v.30, n.1, p.69-75, 2000.

IGARASHI, M.; KANO, F.; TAMEKUNI, K.; MACHADO, R.Z.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C.; GARCIA, J.L. *Toxoplasma gondii*:evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v.118, n.3, 386-392.

INNES, E.A.; VERMEULEN, A.N. Vaccination as a control strategy against teh coccidial parasites *Eimeria, Toxoplasma and Neospora. Parasitology*, v.133, p.145-168, 2006.

INNES, E.A.; BARTLEY, P.M.; MALEY, S.; KATZER, F.; BUXTON, D. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n.2, p.246-251, 2009.

INNES, E.A.; BARTLEY, P.M.; ROCCHI,M.; BENAVIDAS-SILVAM, J.; BURRELS, A.; HOTCHKISS, E.; CHIANINI,F.; CANTON,G.; KATZER,F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: Dead or alive? *Veterinary Parasitology*, v.180, p.155–163, 2011.

ISHAG, M.; MAGZOUB, E.; MAJID, M. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating she camels. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.5, n.6, 456-458, 2006.

ISMAEL, A.; SEKAI, D.B.; COLLIN, C.; BOUT, D.; ME´ VELEC, M.N. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis*. Infeciton and Immunity,* v.71, p.6222–6228, 2006.

JENKINS, M.C. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.101, p.291-310, 2001.

JITTAPALAPONG, S.; SANGVARANOND, A.; PINYOPANUWAT, N.; CHIMNOI, W.; KHACHAERAM, W.; KOIZUMI, S.; MARUYAMA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic gats in Satun Province, Thailand. *Veterinary Parasitology*, v.127, p.895-901, 2005.

JONGERT, E.; VERHELST, D.; ABADY, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein-protein vaccine combination but not by its DNA-protein counterpart. *Vaccine*, v.26, p.5289-5295, 2008.

KANEKO, J.J.; HARVEY, D.W.; BRUSS, W.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KASPER, L.; COURRET, N.; DARCHE, S. et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Journal of Parasitolog.*, v.34, p.401-409, 2004.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii.* IN: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. Parasitologia Humana. São Paulo, Editora Atheneu, 12 ed. 2011. Capítulo 18, p.147-156.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *International Journal for Parasitology*, v.38, p.1359-1370, 2008.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Toxoplasma safe meat: close to reality? *Trends in Parasitology*, v.25, p.8-22, 2009.

LÜDER, C.G.K.; GROSS, U.; LOPES, M.F. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in Parasitology*, v.17, p.480-486, 2001.

MACHADO,P.R.L.; CARVALHO, L.; ARAÚJO,M.I.A.S.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, n.6, p.647-664,2004.

MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. Comput. Biol. Med., v.30, n.3, p.127-134, 2000.

MISHIMA, M.; XUAN, X.; SHIODA, A.; OMATA, Y.; FUJISAKI, K.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T. Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1*. The Journal of Veterinary Medicine Science*, v.63, p.433-438, 2001.

MOR, GIL.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexy*. Am. J Reprod Immunology*, v.63, n.3, p.425-433, 2010.

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; REGINA, M. L.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overprodction of Th1 cytokines. *The Journal of Immunology*, v.167, p.4574-4584, 2001.

NETO, E.C.; ANELE, E.; RUBIM, R.; BRITES, A.; SCHULTE, J.; BECKER, D.; TUUMINEM, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *International Journal of Epidemiology*, v.29, p.941-947, 2000.

OMATA, Y.; SUZUKI, N. Humoral antibody response and transmission of *Toxoplasma* from infected mother rats to their fetus and infants. *Res. Bull. Obihiro University*, v.9, p.265-272, 1975.

O'ROURKE, K. Zoonotic risk of pest: how to handle questions. *Journal of American Medical Association*, v.220, n.10, p.1439-1442, 2002.

PETAKOV, M.; STOJANOVIĆ, N.; JOVCIĆ, G.; BUGARSKI, D.; TODOROVIĆ, V.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. Hematopoiesis during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Haematologia,* v.32, n.4, p.439-55, 2002.

PETTERSEN, E.K. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica,* v.92, n.3, p.175-176, 1984.

PFAFF, A.W.; CANDOLFI, E. New insights in toxoplasmosis immunology during pregnancy. Perspective for vaccine prevention. *Parasitologia*, v.50, n.1-2, p.55-58, 2008.

POWELL, C.C.; BREWER, M.; LAPPIN, M.R. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactanting cats. *Veterinary Parasitology*, v.102, p.29-33, 2001.

REMINGTON, J. S. Toxoplasma in the adult. New York Academiy of Medicine, v. 50, n.2, p.211-227, 1974.

REMINGTON, J.S.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. (Eds). Infectious Diseases of the fetus and Newborn Infants. W. Saunders Co., Philadelphia, p.89-195, 1990.

REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. 2000. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. (eds.), Diseases of the fetus and newborn infant, W H Saunders Company, Philadelphia, p. 205-346.

ROBERTS, F.; McLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. Parasitology Today, v.15, n.2, p.51-57, 1999.

ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, R.T.; BOZZA, M.T.; LIMA, F.R.; PIRES, A.L.; SILVA, P.M.; BONOMO, A.; LANNES-VIEIRA, J.; De SOUZA, W.; MOURA-NETO, V. Soluble factors released by Toxoplasma gondii infected astrocytes down modulate nitric oxide production by gamma interferon activated microglia and prevent neuronal degeneration. Infection and Immunity, v.71, p.2047-2057, 2003.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. The Journal of the American Medical Association , v.116, p.801–807, 1941.

SACKS, J.J.; ROBERTO, R.R.; BROOKS, N.F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *The Journal of the American Medical Association*, v.248, n.14, p.1728-1732, 1982.

SCHREINER, M.; LIESENFELD, O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, p.221-233, 2009.

SILVEIRA, C.; BELFORT, R. JR.; MUCIOLLI, C.; ABREU, M.T.; MARTINS, M.C.; VICTORIA, C.; NUSSENBLATT, R.B.; HOLLAND,G.N. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *American Journal of Ophtalmology*, v.131, p.351-54, 2001.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; KLEIN, C.H.; RIBEIRO, L.C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in south of Brazil*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, p.173-77. 2005.

SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T Lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *The Journal of Immunology*, v.147, p. 3955-3959, 1991.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in Parasitology*, v.22, n.3, 2006.

TAIT, E.D.; HUNTER, C.A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n.2, p.201-210, 2009.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEIIS, M.L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International *Journal for Parasitology*, v.30, n.12-13, p.1217-1258. 2000.

VARELLA, I.S.; WAGNER, M.B.; DARELA, A.C.; NUNES, L.M.; MULLER, R.W.. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *Jornal de Pediatria,* v.79, p. 69-74, 2003.

ZENNER, L.; DARCY, F.; CESBRON-DELAUW, M.F.; CAPRON, A. Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. *Infection and Immunity*, v.61, p.360–363, 1993.

ZENNER, L.; ESTAQUIER, J.; DARCY, F.; MAES, P.;CAPRONI, A.; CESBRON-DELAUW, M.F.C. Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunology*, v.21, p.261–272, 1999.

ZORGI, N.E.; COSTA, A.; GALISTEO JÚNIOR, A.D.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE JÚNIOR, H.F. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T.gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T.gondii*. *Immunology Letters*, v.138, p.187– 196, 2011.

ZULPO, L.Z. Proteção contra a eliminação de oocistos em felinos imunizados com proteínas de roptrias do *Toxoplasma gondii*. Londrina, 2010. 54p. Dissertação de Mestrado – UEL –Universidade Estadual de Londrina.

WANG, T.; LIU, M.; GAO, X.J.; ZHAO, Z.J.; CHEN, X.G.; LUN, Z.R. *Toxoplasma gondii*: The effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Experimental Parasitology*, v.127, n.1, p.107-112, 2011.

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

WYSS, R.; SAGER, H.; MULLER, N.; INDERBITIZIN, F.; KUNING, M.; AUDIGÉ, L., GOTTSTEIN, B. The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as regards meat hygiene. *Schweiz Archives Tierheilkd*, v.142, n.3, p.95-108, 2000.

O artigo apresentado a seguir foi redigido de acordo com as normas do periódico científico Veterinary Parasitology:

Immunization of Wistar female rats with 255-Gy-irradiated *Toxoplasma gondii* : preventing parasite load and maternofoetal transmission

Lucilene Granuzzio Camossi, Felipe Fornazari, Virgínia Bodelão Richini-Pereira, Rodrigo Costa da Silva, Helio Langoni*.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Botucatu-SP, Brazil.

* Corresponding author: Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-970 Botucatu, SP, Brasil. Tel: +55 14 38802093. Fax: + 55 14 38802042.

E-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni)

Abstract

Toxoplasmosis, caused by an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, is an worldwide parasitic disease, with significant importance for animal production and considerable impact to the public health. This study was aimed to evaluate the dynamic of the distribution of *Toxoplasma gondii* in tissues of female wistar rats and their puppies tissues, after the immunization by oral rote with irradiated tachyzoites. One week after pregnancy confirmation, rats was challenged by gavage with *T. gondii* bradyzoites, oocysts or tachyzoites of *T. gondii*. Forty-eight pregnant rats were grouped as follow: G1, immunized and challenged with bradyzoites; G2, non-immunized and challenged with bradyzoites; G3, immunized and challenged with oocysts; G4: non-immunized and challenged with oocysts, G5, immunized and challenged with tachyzoites; G6, non-immunized and challenged with tachyzoites; G7, immunized but non-challenged; G8: non-immunized, neither challenged. After parturition the rats were sacrificed and the tissues were researched for the DNA of *T. gondii* by polymerase chain reaction (PCR) and the parasite load determined by the quantitative PCR (qPCR). It was verified that the immunization with irradiated tachyzoites of *T. gondii* induced the reduction of parasitic load in most organs analyzed, although not prevent the establishment of infection with the parasite. And also, the immunization showed a favorable effect on the birth rate and litter size.

Keywords: Toxoplasmosis; Immunization; Wistar Rats; Parasite load; Zoonosis.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite protozoan, worldwide, causing congenital disease that presents high clinical importance to humans and

domestic animals. It occurs as acute maternal infection during pregnancy which affects the fetus, resulting in severe neurological sequelae and even spontaneous abortion and neonatal mortality. In animals, *T. gondii* infection has considerable economic importance causing abortion, stillbirth and neonatal death, especially in sheep, pigs and goats. In addition, animals destined for human consumption may be persistently infected with *T. gondii*, as tissue cysts in muscles and viscera, acting as important source of parasite transmission to humans and continues to be a public health concern (Dubey and Jones, 2008; Innes et al., 2009; Zhou et al., 2012). The development of vaccines to prevent or reduce *T. gondii* tissue cysts formation in meat animals would be a great benefit to reduce the zoonotic transmission and also provides benefit against abortion in the immunized animals (Boothroyd, 2009; Innes et al., 2009).

In immunocompetent hosts, a primary infection with *T. gondii* leads to the induction of a lifelong protective immunity against clinical disease from a new infection. The apparent protection after natural infection show that protective immunity can be mimicked using a vaccine, this fact explains the intensification of the search for protective antigenic preparations aimed the control of the disease using vaccination (Jongert et al., 2009).

In previous studies, it was found that *T. gondii* RH strain tachyzoites irradiated with 255 Gy do not cause residual infection and induce the same immunity as a natural infection in mice (Zorgi et al., 2011), becoming a suitable candidate vaccine. However, no convincing evidence exists to show that vaccination strategies preventing the cyst formation in either humans or animals, which would be highly desirable. In food animals, it would diminish the availability of the meat infected with *Toxoplasma*, so as to reduce rate of human infection from the ingestion of undercooked infected meat

(Falcón and Freyre, 2009). In this way, the present study was aimed to evaluate the capability and dynamics of an irradiated *T. gondii* vaccine to confer protection against the accessibility and development of the parasites in the muscles, brain and visceral organs in immunocompetent rats, and in materno-foetal transmission by use quantitative assay in monitoring the parasite load in response to immunization.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female Wistar Rats, 14-weeks-old, weighs on average 250 g, non isogenic were used for immunization, male rats were used only in breeding (between 100 and 120 days), weighs 350 g, were obtained from CEMIB/UNICAMP and kept in pathogen free condition All rats were maintained under standard, with commercial feed (Nuvilab® CR1, Brazil) and sterile drink water. Animals were manipulated in compliance with the ethical guidelines adopted by Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, being the experimental protocol approved by the local Ethics Committee (protocol 282/10).

2.2. Toxoplasma strain

Strains RH (type I) and ME-49 (type II) of *T. gondii* were used in the present study. RH tachyzoites were obtained by successive intraperitoneally passages in mice every 3 days, whereas ME49 tissue cysts were obtained by the inoculation of bradyzoites in mice, orally. It was also used as a source of tissue cysts 60 days after infection. The brain of these mice were removed and homogenized and the subjected to acid digestion by pepsin to release viable bradyzoites (Dubey, 1998). ME49 oocysts were obtained from feces of cats fed with this strain. Oocysts were recovered by flotation method and sporulation was performed in 2% sulfuric acid.

94 *2.3. Experimental design*

95 Female rats were grouped in eight groups with 6 rats each, as follow: G1, immunized
96 and challenged with 10^2 bradyzoites.mL^{-1}; G2, non-immunized and challenged with 10^2
97 bradyzoites.mL^{-1}; G3, immunized and challenged with 10^2 oocysts.mL^{-1}; G4, non-immunized
98 and challenged with 10^2 oocysts.mL^{-1}; G5, immunized and challenged with 10^2 tachyzoites.mL^{-}
99 ^{1}; G6, non-immunized and challenged with 10^2 tachyzoites.mL^{-1}; G7, immunized but non-
100 challenged; G8 (control group), non-immunized, neither challenged (Fig1).

101 The immunized groups (G1, G3, G5, G7) received the vaccine candidate orally, in three
102 dose of 1mL containing 1x10^7 irradiaded tachyzoites. Each animal received a dose on day 0 and
103 a booster vaccination on days 14 and 28. Females were mated with males one week after the last
104 immunization, and challenged one week after mating. Seven days after confirmation of mating
105 (14 days after the last immunization procedure), after evidencing the presence of vaginal plug,
106 female rats were orally infected by oral gavage.

107 Blood samples were collected weekly by cardiac puncture. Rats were kept in complete
108 anesthesia, by intramuscular administration of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).
109 All samples were stored at –20^{o}C prior the test. Tissue samples were collected at the euthanasia
110 day. The rat organs were removed, macerated e prepared for DNA extraction. Immediately after
111 the newborns birth, they were euthanatized and the brain, lung, heart, spleen, liver, forelimb
112 muscle (right and left), hindlimb muscle (right and left) and dorsal muscle (right and left) were
113 collected for the extraction, detection and quantification of the *T. gondii* DNA.

114

115 *2.4. Vaccine and Immunization*

116 *T. gondii* RH strain tachyzoites were obtained from the peritoneal cavity of infected
117 mice by RPMI 1640 (GIBCO, UK) medium washings. Parasites were kept on ice, submitted to
118 the irradiation with 255Gy from a uniform source of 60-Cobalt (Gammacell, AECL, Canada)
119 and cryopreserved in liquid nitrogen. Rats of immunized groups received 3 biweekly doses of

120 10^7 irradiated tachyzoites, the vaccine candidate. The parasites were administered by oral
121 gavage suspended in aluminum hydroxide.
122
123 *2.5. DNA extraction*
124 DNA was extracted from samples using the Illustra Genomic Tissue & Cells
125 genomic Prep Mini Spin Kit (GE-Healthcare). Each tissue of each animal (200mg) was
126 macerated in mortar and pestile, with liquid nitrogen until getting powder form, and
127 diluted in 50µL PBS 0.01M pH7.2. The DNA extraction was performed using 200µL of
128 fluid tissue. Fluids were centrifuged at 11000*g* form 5 min, and pellets were incubated
129 at 56°C for 60 min in a solution containing 100 µL of lysis buffer and 20 µL of
130 proteinase K (20mg/mL), proceeding with extraction according to the kit manufacturer's
131 instructions.
132
133 *2.6. conventional PCR (cPCR)*
134 Conventional PCR was performed in a final volume of 25µL containing PCR
135 buffer 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0), 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM
136 desoxyribonucleotides (Life Technologies, USA), 10µM of each primer (Integrated
137 DNA Technologies, USA, 0.2U Platinum *Taq* DNA polymerase (Life Technologies,
138 USA), 2µL of the purified DNA (10ηg), and ultrapure water q.s.p. (Gibco, USA).
139 Specific primers targeting a 200-300 repetitive sequence in *T. gondii* DNA and
140 producing a 529bp fragment (Homan et al., 2000) was used, as follow: TOX 4 5'-
141 CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3' and TOX5 5'-
142 CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'. The PCR protocol consisted in an
143 initial incubation of 94ºC per 7 min, followed by 35 cycles of 94ºC per 1 min, 60ºC per

1 min and 72ºC per 1 min, and a final incubation of 72ºC per 10 min. All amplifications were performed in a MasterCycler EP gradient termocycler (Eppendorf, USA). Each amplification included positive and negative controls. The products were visualized on a 1.5% agarose gel (Life Technologies, USA) and detected after staining with 0.3μL.mL^{-1} ethidium bromide in 1X Tris-borate-EDTA (Life Technologies, USA). The products were visualized and analyzed on the Gel-Doc-it visualization system (UVP, USA).

2.7. Quantitative PCR (qPCR)

The parasite load of each tissue was quantified by the qPCR. qPCR was performed using SYBR®Green system (Life Technologies, USA) and the StepOne™ Plus RealTime PCR System (Life Technologies, USA). The specific primers TOX529-F (5'-CACAGAAGGGAXAGAAGT-3') and TOX529-R (5'-TCGCCTTCATCTACAGTC-3') was used to target a 200-300 repetitive sequence in the parasite genome (Homan et al., 2000), amplifying a product of 96bp (Edvinsson et al., 2006). For each sample a total volume of 25uL was used, as follows: 12.5μL Power SYBRGreen PCR Master Mix (Life Technologies, USA), 5μM each primer (Integrated DNA Technologies, USA), 8.5μL ultrapure water (Gibco, USA), 2μL sample, total final volume 25 μL.

2.8. Data analysis

All data were tabulated on an Excel spreadsheet. Per tissue sample, the mean and median number of parasites.mL^{-1} in each group of animals was calculated. The statistically significant differences in the number of parasites in tissue samples among

the groups of rats and by ieach kind of tissue were calculated by Mann-Whitney test, using the GraphPadPrism v.5.01 and GraphPad Instat v.3.06 software. Statistics related to the performance of results obtained by qPCR were calculated by using cPCR as a gold standard, utilizing the spreadsheet described by Mackinnon (2000). Differences were considered significant if the *P* value was < 0.05.

3. Results

Comparative positivity of cPCR for the 528 tissue extracts are shown in Table 1. In immunized groups, qPCR resulted positive in 124 samples in contrast to only 34 by cPCR, with a poor concordance (κ = 29.7%; positive concordance = 43.9%; negative concordance = 76.7%). Non-immunized group presented 110 positive tissue samples by qPCR, compared to only 60 samples by cPCR, presenting a moderate concordance (κ = 56.6%; positive concordance = 69.1%; negative concordance = 85.6%), confirming the better sensitivity of the former technique.

Results of q PCR are shown in Fig2 and 3. A decrease in parasite load was observed in the brain of rat from G1 compared to those from G2 (Fig2), but did not differ statistically ($P>0.05$). Similar results was observed in G3 with lower parasite load than G4. In this comparison, a significant difference can be observed ($P\leq0.05$). In G5 and G6), a low brain parasite load was observed. In G7 was verified a minimum detection of parasite DNA (< 5 parasites/mL), but no DNA was detected in G8.

Analyzing the heart samples, parasite load was higher in G2 and G4. Even that, no significant difference was observed between G1 and G2 ($P=0.40$), and between G3and G4 ($P=0.61$). Moreover, no parasite DNA could be detected in most of the spleen samples, in all groups. qPCR showed that in lung tissue the median parasite load

192 was lower in G1 and G3, and no DNA detection was observed in G6. In liver, the
193 median parasite load was higher in G6 than the other groups, but no significative
194 difference was observed when compared to G5 (P=0.19).

195 In Fig3, in most of muscle samples the parasite load was lower in G1 and G3,
196 compared G2 and G4. The exceptions were observed in left dorsal (P=0.66)and left
197 forelimb (P=0.40) muscle samples in which the parasite loads were higher in G3 than
198 G4.

199 Analyzing the distribution and the concentration of *T. gondii* parasites in
200 neonates (Table 2), All female rats were mated, but confirmation of pregnancy has not
201 been observed in all animals. Abortions were not observed in the analyzed groups.
202 qPCR shown no significant differences concerning the parasite load in neonates born
203 from immunized rats compared to those born from non-immunized rats. Meanwhile, the
204 birth rate of the offspring from the groups of non-immunized rats was lower than those
205 of immunized groups and control groups. Even the fecundity observed in G3 (83.30%)
206 was the same than G7 and G8, the lower percentage of infected mice (25.53%) was
207 observed among the infected groups (G1 to G6), that ranged from 50% to 88.89%. In all
208 infected groups, the parasite load median ranged from 0.00 (G3) to 3.89 (G1)
209 parasites.mL^{-1}.

210

211 4. Discussion

212 Vaccine candidates for toxoplasmosis are able to induced cellular and humoral
213 immune response. However, there is few evidences to indicate the immunization effect
214 on tissue parasite load and congenital transmission. Several studies evaluates the
215 distribution of *T. gondii* in tissues commonly performed in immunized animals by

bioassay and conventional PCR (Freyre et al., 2006; 2008), scarcely amount of parasites was quantified in immunized animals. The different animal models used in the various studies difficult to compare the results obtained. Furthermore, the various techniques employed for each study and other important variables such as strain virulence and infectious dose, also make it difficult to compare studies.

Brain and skeletal muscle were revealed to be the *T. gondii* predilection organ in rats with the most positive samples as well as the highest numbers of parasites per sample in immunized and non-immunized groups, which is generally considered as a predilection organ for *T.gondii*.

There were greater parasite loads with cystogenic strains (ME-49), mostly in groups challenged by oocysts infectious stage. It is emphasized that this evolutionary stage of the parasite has a higher number of infective forms, since each oocysts contains eight sporozoites.

In the groups challenged with tachyzoites (groups 5 and 6) were found the lowest rate of positivity by conventional PCR and lower parasite load by quantitative PCR, due to feature not cystogenic RH strain.

In this study, the number of positive samples were higher in the quantitative PCR, this fact can be explained by the minimum detection limit of conventional PCR, which was 10^2 parasites, this means, samples with less than this parasite count were given a false negative result.

The main advantage of qPCR over than cPCR is that the results are generated in a continuous parasite number, increased analytical and diagnostic sensitivity , and it can be performed in a closed system where post-PCR handling is not required; Moreover, the risks of contamination are minimal, the assay after DNA extraction can be obtained

in only 2 h, these methods are easy-to-use, producing results more readily than in conventional PCR systems (Calderaro et al., 2006).

In this study no statistical difference was observed in parasite load among neonates born to rats immunized compared to neonates of non immunized rats, however, litter size and percentage of fertility was higher in groups immunized. The percentage of infected newborns was higher in children of non-immunized rats. Despite the non-observance of abortions, litter size and percentage of fertility was lower in the groups of rats not immunized, it appears that embryonic death may have occurred early in the pregnancy. Although, there is no difference in parasite load among infants, there is a beneficial effect in the vaccine, because the groups receiving immunization, there was a higher birth and fertility of female rats was greater. It is important to emphasize that the uterus of females was only examined macroscopically after euthanasia of the rats, which suggests that if there were fetal death, this occurred early in gestation.

Most studies evaluate the effect of *T. gondii* infection on their offspring of pregnant without use of quantitative PCR (Freyre et al., 2003; Freyre et al., 2006). Flori et al. (2002) evaluated the materno-foetal transmission by qPCR. The mean neonatal parasite load was greater in cystogenic strains, as ME-49, although in another laboratory animal mode and without immunization protocols, making it difficult to compare data.

The results of the present study indicate that immunization with irradiated tachyzoites of *T. gondii* not prevent the establishment of infection with the parasite although induced reduction of parasite load in the brain, in all challenges, in muscle tissue the challenge with tachyzoites and oocysts, and in cardiac tissue challenge with oocysts. The immunization showed a favorable effect on the birth rate. As immunization promotes reduced parasitism that can mean a lower parasite load, it could

reduce the clinical symptoms in infected animals or reduce epidemiological via high importance to human infection by reducing the parasite in muscles and organs of meat animals.

References

Boothroyd, J.C., 2009. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. Int. J. Parasitol., 39, 935-946.

Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Peruzzi, S., Zerbini, L., Bommezzadri, S., Dettori, G. Chezzi, C. 2006. Comparison between two Real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. Acta. Biomed., 77, 75-80.

Dubey, J.P., 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. Vet. Parasitol., 74, 75-77.

Dubey, J.P., Jones, J.L., 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int. J. Parasitol., 38, 1257-1278.

Edvinsson, B., Lappalainen, M., Evengård, B., 2006. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Infect., 12, 131-136.

Falcón, J., Freyre, A., 2009. *Toxoplasma gondii*: Prototype immunization of lambs against formation of muscle and brain cysts. Vet. Parasitol., 166, 15-20.

Flori, P., Hafid, J., Bourlet, T., Raberin, H., Genin, C., Sung, R.T.M., 2002. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. J. Med. Microbiol., 51, 871-878.

Freyre, A., Falcón, J., Mendez, J., Gonzalez, M., Venzal, J.M., Morgades, D., 2003. *Fetal Toxoplasma infection after oocysts inoculation of pregnant rats*. Parasitol. Res., 89, 352-353.

289 Freyre, A., Falcón, J., Mendez, J., Rodriguez, A., Correa, L., Gonzalez, M., 2006.
290 *Toxoplasma gondii*: Partial cross-protection among several strains of the parasite
291 against congenital transmission in a rat model. Exp. Parasitol., 112, 8-12.
292 Freyre, A., Falcón, J., Mendez, J., Gonzalez, M., 2006. *Toxoplasma gondii*: Differential
293 protection rates by two strains against cyst formation in a rat model. Exp. Parasitol.,
294 114, 265-270.
295 Freyre, A., Falcón, J., Mendez, J., Gonzalez, M., 2008. *Toxoplasma gondii*: Protection
296 against colonization of the brain and muscles in a rat model. Exp. Parasitol., 119, 252-
297 255.
298 Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer J., Verschueren, H., 2000.
299 Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma*
300 *gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int. J. Parasitol., 30, 69-75.
301 Innes, E.A., Bartley, P.M., Maley, S., Katzer, F., Buxton, D., 2009. Veterinary vaccines
302 against *Toxoplasma gondii*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 104, 246-251.
303 Jongert, E., Roberts, C.W., Gargano, N., Foster-Wald, E., Petersen, E., 2009. Vaccines
304 against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.,
305 104, 252-266.
306 Mackinnon, A., 2000. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for
307 the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. Comput. Biol. Med., 30(3),
308 127-134.
309 Zhou, H., Min, J., Zhao, Q., Gu, Q., Cong, H., Li, Y., He, S., 2012. Protective immune
310 response against *Toxoplasma gondii* elicited by a recombinant DNA vaccine with a
311 novel genetic adjuvant and molecular evaluation of *Leishmania* infantum in cats from
312 central Spain. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1149, 361-364. Vaccine, 30, 1800-1806.

Zorgi, N.E., Costa, A., Galisteo Júnior, A.J., Nascimento, N., Andrade Júnior, H.F., 2011. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. Immunol. Letters, 138,187-196.

Figure 1. Experimental design of the groups used for the immunization and the challenge of the 255-Gy-irradiated *T. gondii* tachyzoites.

Variants	**Experimental Groups**							
	G1	**G2**	**G3**	**G4**	**G5**	**G6**	**G7**	**G8**
Sex	female	female	female	female	female	female	female	female
Number of rats	six	six	six	six	six	six	six	six
Immunization	yes	no	yes	no	yes	no	yes	no
Challenge	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no	no
Infectant form challenged	bradyzoites	bradyzoites	oocysts	oocysts	tachyzoites	tachyzoites	nd	nd

Table 1. Estimate ± standard error (SE ±EST) and 95% confidence interval (95%) of the Kappa coefficient (κ), and positive and negative concordance between the techniques of polymerase chain reaction by conventional (PCR) and real-time (qPCR) for DNA research *T. gondii*.

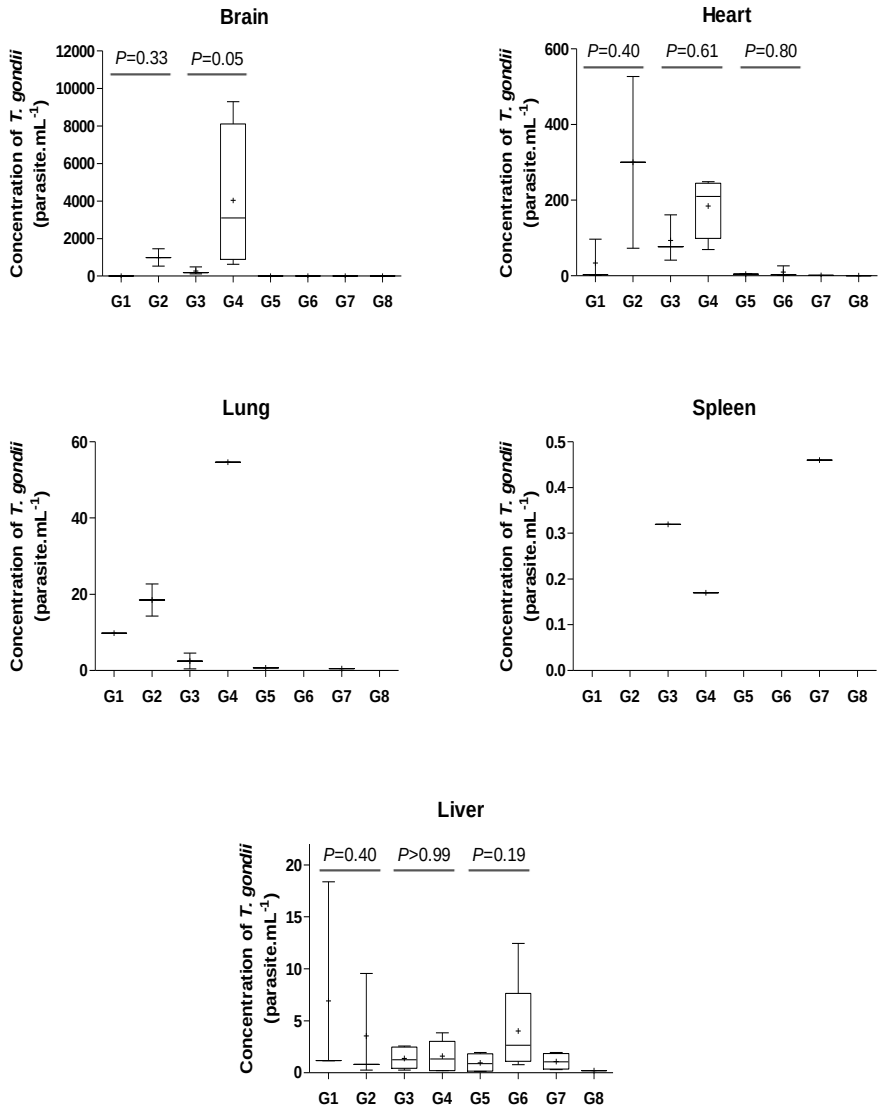
	Statistic	N*	PCR	qPCR	Kappa (κ)		Positive concordance		Negative concordance	
					STA±SE	IC95%	STA±SE	IC95%	STA±SE	IC95%
	Total**	528	92	213	47,6 ± 3,6	40,6 – 54,6	60,3 ± 3,3	53,8 – 66,8	83,9 ± 1,5	81,1 – 86,7
	Immunized†	264	34	124	29,7 ± 4,4	21,1 – 38,4	43,9 ± 5,0	34,1 – 53,6	76,7 ± 2,4	71,9 – 81,4
	NonImmunized†	264	60	110	56,6 ± 4,9	47,0 – 66,1	69,1 ± 4,1	61,1 – 77,1	85,6 ± 2,0	81,7 – 89,4
Immunized Groups	Brain	24	3	6	60,0 ± 19,8	21,2 – 98,8	66,7 ±18,1	31,1 – 100,0	92,3 ±4,4	83,6 – 100,0
	Heart	24	2	13	14,3 ± 9,8	-4,9 – 33,5	26,7 ± 15,0	-2,8 – 56,1	66,7 ± 9,5	48,1 – 85,2
	Lung	24	0	2	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	95,7 ± 3,1	89,6 – 100,0
	Spleen	24	0	0	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	100,0 ± 0,0	100,0
	Liver	24	0	10	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	73,7 ± 8,0	58,0 – 89,4
	Forelimb left	24	5	12	41,7 ± 15,1	12,1 – 71,2	58,8 ± 14,2	31,0 – 86,6	77,4 ± 8,3	61,1 – 93,7
	Forelimb right	24	5	17	19,6 ± 9,8	0,4 – 38,7	45,5 ± 13,2	19,6 – 71,3	53,9 ± 11,8	30,7 – 77,0
	Hindlimb left	24	5	15	27,3 ± 12,1	3,6 – 50,9	50,0 ± 13,7	23,2 – 76,8	64,3 ± 10,6	43,6 – 85,0
	Hindlimb right	24	5	14	31,7 ± 13,2	5,9 – 57,4	62,5 ± 13,9	25,4 – 79,9	69,0 ± 9,8	49,7 – 88,2
	Dorsal muscle left	24	6	16	28,6 ± 12,1	4,9 – 52,2	54,6 ± 12,8	29,5 – 79,6	61,5 ± 11,2	39,5 – 83,5
	Dorsal muscle right	24	3	16	13,3 ± 8,1	-2,6 – 29,3	31,6 ± 13,8	4,5 – 58,7	55,2 ± 11,1	33,4 – 77,0
Non Immunized groups	Brain	24	9	10	91,3 ± 8,5	74,7 – 100,0	94,7 ± 5,3	84,4 – 100,0	96,6 ± 3,5	89,8 – 100,0
	Heart	24	5	11	47,5 ± 15,8	16,5 – 78,4	62,5 ± 14,2	34,5 – 90,3	81,3 ± 7,5	66,5 – 96,0
	Lung	24	1	3	46,7 ± 30,5	-13,20 – 100,0	50,0 ± 30,6	-10,0 – 100,0	95,5 ± 3,2	89,2 – 100,0
	Spleen	24	0	0	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	100,0 ± 0,0	100,0
	Liver	24	0	8	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 – 0,0	80,0 ± 6,9	66,4 – 93,6
	Forelimb left	24	5	14	31,7 ± 13,2	5,9 – 57,4	52,6 ±13,9	25,4 – 79,9	69,0 ± 9,8	49,7 – 88,2
	Forelimb right	24	7	12	58,3 ± 15,1	28,8 – 87,9	73,7 ± 11,4	51,4 – 95,9	82,8 ± 7,6	67,9 – 97,6
	Hindlimb left	24	8	12	66,7 ± 14,3	38,6 – 94,8	80,0 ± 9,8	60,8 – 99,2	85,7 ± 7,1	71,9 – 99,6
	Hindlimb right	24	8	13	59,5 ± 14,8	30,6 – 88,4	76,2 ± 10,3	55,9 – 96,5	81,5 ± 8,1	65,5 – 97,4
	Dorsal muscle left	24	7	13	51,7 ± 15,0	22,4 – 81,0	70,0 ± 11,7	47,1 – 92,9	78,6 ± 8,5	61,8 – 95,3
	Dorsal muscle right	24	8	14	52,6 ± 14,8	23,7 – 81,5	72,7 ± 10,7	51,7 – 93,7	76,9 ± 9,2	59,0 ± 04,9

Legend: * total number of animals in each group; ** independent group analyzed and organ analyzed; † independent analyzed organ.

Table 2. Birth rate and congenital infection in rats of experimental groups, with respective median parasite load and 25% percentile (P25) and 75% (P75) for *T. gondii* in newborns trial, comparing vaccinated with unvaccinated group, according to the inoculated infective form.

Group	Liter size	Mean	Fecundity (%)	Total infected	% Infected	Parasite load Median (parasitos.mL^{-1})	P25 – P75	Statistic U*	*P*†
1	42	7,00	66,60	35	83,33	3,83	1,33 – 7,69	346,50	0,6170
2	18	3,00	33,30	16	88,89	3,89	2,22 – 6,29		
3	47	7,83	83,30	12	25,53	0,00	0,00 – 1,00	333,00	0,1873
4	18	3,00	33,30	10	55,56	1,23	0,00 – 2,41		
5	46	7,67	66,60	23	50,00	0,78	0,00 – 2,11	236,50	0,7461
6	15	2,00	33,30	8	53,33	1,71	0,50 – 1,81		
7	51	8,50	83,30	23	45,10	0,00	0,00 – 1,74	-	-
8	50	8,33	83,30	0	0,00	0,00	0,00 – 0,00		

Legend: * Mann-Whitney non-parametric test (U); † *P* value for the significance level of 5%.



370

371 **Figure 2.** Boxplots (median,first and third quartile) of parasites per mL of tissue
372 analyzed for rats of immunized groups challenged bradyzoites (1) and non-immunized
373 groups challenged bradyzoites (2), immunized groups challenged oocysts (3) and non-
374 immunized groups challenged oocysts (4), immunized groups challenged tachyzoites
375 (5) and non-immunized groups challenged tachyzoites (6), immunized control (7), non
376 immunized, non-challenged control (8).
377 Statistic: Mann-Whitney non-parametric test (U)
378
379
380

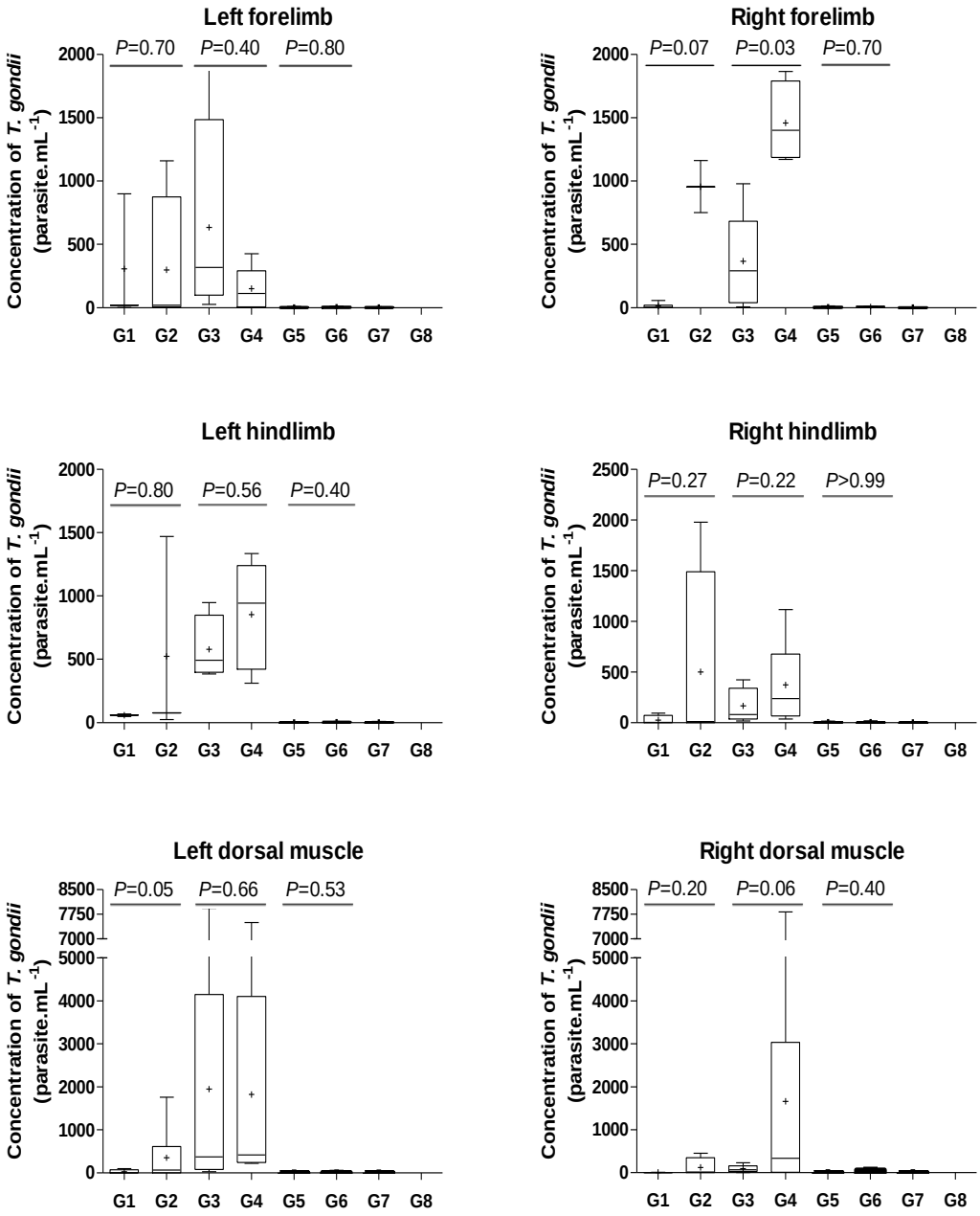


Figure 3. Boxplots (median,first and third quartile) of parasites per mL of muscle tissue analyzed for rats of immunized groups challenged bradyzoites (1) and non-immunized groups challenged bradyzoites (2), immunized groups challenged oocysts (3) and non-immunized groups challenged oocysts (4), immunized groups challenged tachyzoites (5) and non-immunized groups challenged tachyzoites (6), immunized control (7), non immunized, non-challenged control (8).
Statistic: Mann-Whitney non-parametric test (U)