

AÇÃO DA β -GLUCANA EM SUÍNOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM TAQUIZOÍTOS DO *Toxoplasma gondii*

FELIPE M. BUGNI¹; IVO ALEXANDRE L. DA CUNHA¹; MAITHÊ A. DE ARAÚJO¹; MARA CRISTINA R. DA COSTA²; GRAZIELA D. PACHECO²; PATRÍCIA FERNANDES N. SILVA¹; MARA REGINA S. BALARIN¹; CAIO ABÉRCIO DA SILVA²; ITALMAR TEODORICO NAVARRO¹; JOÃO LUIS GARCIA¹

ABSTRACT:- BUGNI, F.M.; CUNHA, I.A.L.; ARAÚJO, M.A.; COSTA, M.C.R.; PACHECO, G.D.; SILVA, P.F.N.; BALARIN, M.R.S.; SILVA, C.A.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L. [Action of β -glucan in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* tachyzoites]. Ação da β -glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 249-259, 2008. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brasil. E-mail: jlgarcia@uel.br

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

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*, pigs, RH strain, β -glucan, PCR, bioassay.

RESUMO

No presente trabalho foi avaliada a ação da β -Glucana em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*. Foram utilizados oito suínos (21 dias de idade). Os animais foram divididos em três grupos: G1 (β -glucana e

infectados, n=3), G2 (não tratados e infectados, n=3) e G3 (não tratados e não infectados, n=2). Os animais do G1 foram tratados com 1g de β -glucana pela via intramuscular (IM) nos dias 0, 14, e 28 antes da infecção experimental, enquanto os do G2 e G3 receberam apenas solução salina estéril. Os animais do G1 e G2 foram infectados com taquizoítos (10^7) da cepa RH (IM), no dia 35 do experimento. A parasitemia foi determinada por PCR e ensaio biológico em camundongos a partir do sangue total de cada animal, colhido nos dias 3, 7, 14, 21, 31, 39, 47 e 69 pós-infecção. Os títulos de anticorpos contra *T. gondii* foram obtidos dos suínos pela imunofluorescência indireta (IFI) dos soros, humor aquoso e humor vítreo, considerando positivo um título ≥ 64 . Diferenças estatísticas

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990, Brasil. E-mail: jlgarcia@uel.br

² Departamento de Zootecnia, CCA, UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, Londrina, PR 86051-990.

foram observadas na avaliação dos teores de hemoglobina, percentual de hematócrito, valores de proteínas plasmáticas e na contagem de eosinófilos ($P < 0,05$). Os suínos do G1 e G2 soro converteram sete dias pós-infecção, e o maior título encontrado foi de 1024 em dois animais. As amostras de humor aquoso e humor vítreo não revelaram títulos de anticorpos pela IFI. Parasitas no sangue foram detectados nos dias 3, 14, 31, 39 e 47 em dois animais do G1, e em três do G2. Não houve diferenças entre o PCR e o bioensaio. As avaliações das retinas tanto no ensaio biológico quanto no PCR foram negativas em todos os animais. Os animais do G3 permaneceram negativos durante todo o experimento. O uso da β -glucana, na forma como foi utilizada no presente trabalho, não foi efetiva no controle da infecção aguda contra taquizoítos inoculados pela via intramuscular em suínos. A linhagem da cepa RH mostrou-se não cistogênica para suínos (músculos e retina) 69 dias após a infecção.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, cepa RH, suínos, β -glucana, ensaio biológico, PCR.

INTRODUÇÃO

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

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

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

A β -glucana é um dos principais componentes da parede celular das leveduras (OLIVEIRA et al., 2006). A extração da β -glucana de leveduras é decorrente da suspensão de partículas de β -1,3 polissacarídeos (DI LUZIO et al., 1979). A atividade das β -glucanas “in vitro” tem sido descrita como ativadoras diretas de leucócitos, estimulando fagocitose, citotoxicidade e atividades antimicrobiológicas. Os leucócitos que possuem atividades de receptores para as β -glucanas

são os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células exterminadoras naturais (EN), além de outras células não pertencentes ao sistema imune, tais como: células endoteliais, do epitélio alveolar e fibroblastos (BROWN; GORDON, 2003).

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

Hetland et al. (1998) injetaram 100 μ g de β -glucana solúvel pela via intravenosa em camundongos BALB/c três dias antes e sete dias após desafio com bacillus Calmette-Guérin (BCG). Os resultados encontrados indicaram uma inibição da infecção dos camundongos quatro semanas após o desafio. Essa proteção se deu, principalmente, pela ativação de macrófagos.

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

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *T. gondii*

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

Preparo da suspensão de taquizoítos de *T. gondii*

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

Animais

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

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

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

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em três grupos: G1, G2 e G3; com três animais no G1 e G2 e com dois no G3 (Tabela 1).

Tabela 1. Delineamento experimental.

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

IM= Via Intramuscular.

Todos os animais foram abatidos em frigorífico com inspeção federal após 69 dias da infecção. No abate foram obtidas amostras de músculos (masseter, língua, coração e diafragma) e dos olhos (direito e esquerdo) para avaliação da presença de cistos teciduais, bem como soro, humor aquoso e vítreo para detecção de anticorpos contra *T. gondii*.

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

Extração da β -glucana

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

A autólise da levedura de panificação foi realizada adicionando-se água destilada até a obtenção de aproximadamente 25% (p/v) de sólidos totais. Em seguida o pH foi ajustado para 5,0 - 5,5 e a suspensão assim obtida levada à temperatura de 50°C . Após 24 horas, a suspensão foi centrifugada a $3000 \times g$ durante seis minutos. Os sólidos úmidos obtidos após centrifugação correspondem à parede celular. A extração da β -glucana insolúvel foi realizada seguindo o procedimento preconizado por Suphantharika et al. (2003). Após a extração a β -glucana foi solubilizada.

Diagnóstico sorológico

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

Ensaio biológico

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

Pesquisa de *T. gondii* nos tecidos dos suínos

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

As amostras de músculos foram processadas a partir de um *pool* contendo 6,25 g de língua, masseter, diafragma e coração de cada animal, totalizando 25 g de músculos. Este *pool* muscular foi macerado e homogeneizado em 125 mL de salina. Após homogeneização, foram adicionados 125 mL de fluido digestivo artificial (2,6 g de pepsina, 5,0 g de NaCl, 7,0 mL de HCl e 500 mL de água q.s.p.). Os homogeneizados foram incubados a 37°C por 60 minutos sob agitação e posteriormente filtrados em gaze com oito dobras. As porções de 250 mL foram centrifugadas a $1.180 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 50 mL de solução salina-bicarbonato (1,2%) e novamente centrifugado. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 5 mL de salina com penicilina-estreptomicina e posteriormente inoculado em camundongos. Para cada amostra de *pool* muscular e retina foram inoculados três camundongos pela via subcutânea (1 mL/camundongo) (DUBEY, 1998).

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

Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos e do sangue foi realizada conforme descrito previamente por Garcia (2006b). Após a

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

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

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

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

A reação de PCR foi realizada com uma mistura contendo 5 μL da solução obtida na extração mais 20 μL (volume final de 25 μL) da mistura de 1,0 mM de cada primer, 100 mM dNTP (Invitrogen, life technologies, USA), 60 mM Tris-HCl (pH 9,0), 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, life technologies, USA). A amplificação do DNA do *T. gondii* foi obtida ao fim de 35 ciclos no termociclador PTC-100 (MJ-Research), realizando a reação com as seguintes condições: 7 minutos a 94 °C para a desnaturação no ciclo um; seguido de 33 ciclos, com 1 minuto a 94 °C para a desnaturação, 1 minuto a 55 °C para o anelamento e 1 minuto a 72 °C para a extensão. No ciclo 35 foi realizada uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Aliquotas de todos os PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%. Controles positivos e negativos foram adicionados em cada reação. Taquizoítos da cepa RH ($10^7/\text{mL}$) foram diluídos em uma amostra de sangue, digestão péptica e retina. Foi realizada a extração do DNA dessas amostras para o uso como controle positivo. O controle negativo consistiu na extração do DNA das mesmas amostras sem a adição do *T. gondii*.

Sensibilidade da PCR

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

Análise estatística

As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo ANOVA. O teste t de Student foi utilizado para averiguar diferenças estatísticas entre os grupos. Para avaliar as diferenças entre as

porcentagens de detecção da parasitemia utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Utilizou-se o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Sinais Clínicos

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

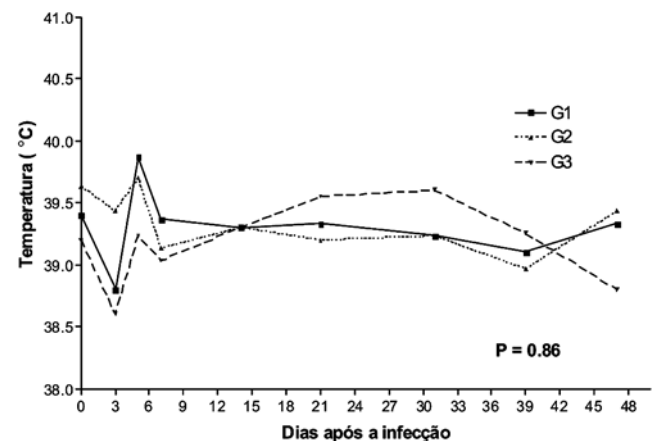


Figura 1. Temperatura retal dos suínos dos três grupos experimentais (G1=β-glucana + infectado, G2=infectado, G3=controle). Os animais foram infectados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular no dia 0.

Valores Hematológicos

Os resultados hematológicos estão representados nas Figuras 2, 3 e 4. Houve diferença significativa entre os grupos nos resultados do hematócrito (Figura 2), $\mu\text{G1} = 34,5 \pm 3,41$, $\mu\text{G2} = 35 \pm 0,96$, $\mu\text{G3} = 31,7 \pm 3,52$ ($P = 0,02$, $G2 \text{ vs } G3 = 0,009$); hemoglobina (Fig.2), $\mu\text{G1} = 11,1 \pm 1,24$, $\mu\text{G2} = 11,5 \pm 1,49$, $\mu\text{G3} = 9,83 \pm 1,08$ ($P = 0,04$; $G2 \text{ vs } G3 = 0,02$); dos eosinófilos (Figura 3), $\mu\text{G1} = 249 \pm 156$, $\mu\text{G2} = 49 \pm 43$, $\mu\text{G3} = 87 \pm 111$ [$P = 0,004$; $G1 \text{ vs } G2$ ($P = 0,004$); $G1 \text{ vs } G3$ ($P = 0,03$)] e das proteínas plasmáticas (Figura 4), $\mu\text{G1} = 7,28 \pm 0,377$, $\mu\text{G2} = 7,05 \pm 0,321$, $\mu\text{G3} = 6,67 \pm 0,403$ [$P = 0,01$; $G1 \text{ vs } G3$ ($P = 0,007$)].

Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos nos resultados de contagem de hemácias (Figura 2), $\mu\text{G1} = 5,79 \pm 0,57$, $\mu\text{G2} = 5,61 \pm 0,47$, $\mu\text{G3} = 5,2 \pm 0,61$ ($P = 0,13$); leucócitos (Figura 2), $\mu\text{G1} = 18209 \pm 2913$, $\mu\text{G2} = 16439 \pm 4436$, $\mu\text{G3} = 15551 \pm 5283$ ($P = 0,32$); neutrófilos (Figura 3), $\mu\text{G1} = 8920 \pm 1226$, $\mu\text{G2} = 8023 \pm 2269$, $\mu\text{G3} = 8311 \pm 2868$ ($P = 0,65$); linfócitos (Figura 3), $\mu\text{G1} = 8686 \pm 2708$, $\mu\text{G2} = 8066 \pm 3127$, $\mu\text{G3} = 6905 \pm 2731$ ($P = 0,23$); e monócitos (Figura 3), $\mu\text{G1} = 95 \pm 78$, $\mu\text{G2} = 146 \pm 208$, $\mu\text{G3} = 159 \pm 174$ ($P = 0,69$) e fibrinogênio (Figura 4), $\mu\text{G1} = 262 \pm 105$, $\mu\text{G2} = 279 \pm 100$, $\mu\text{G3} = 198 \pm 79$ ($P = 0,21$).

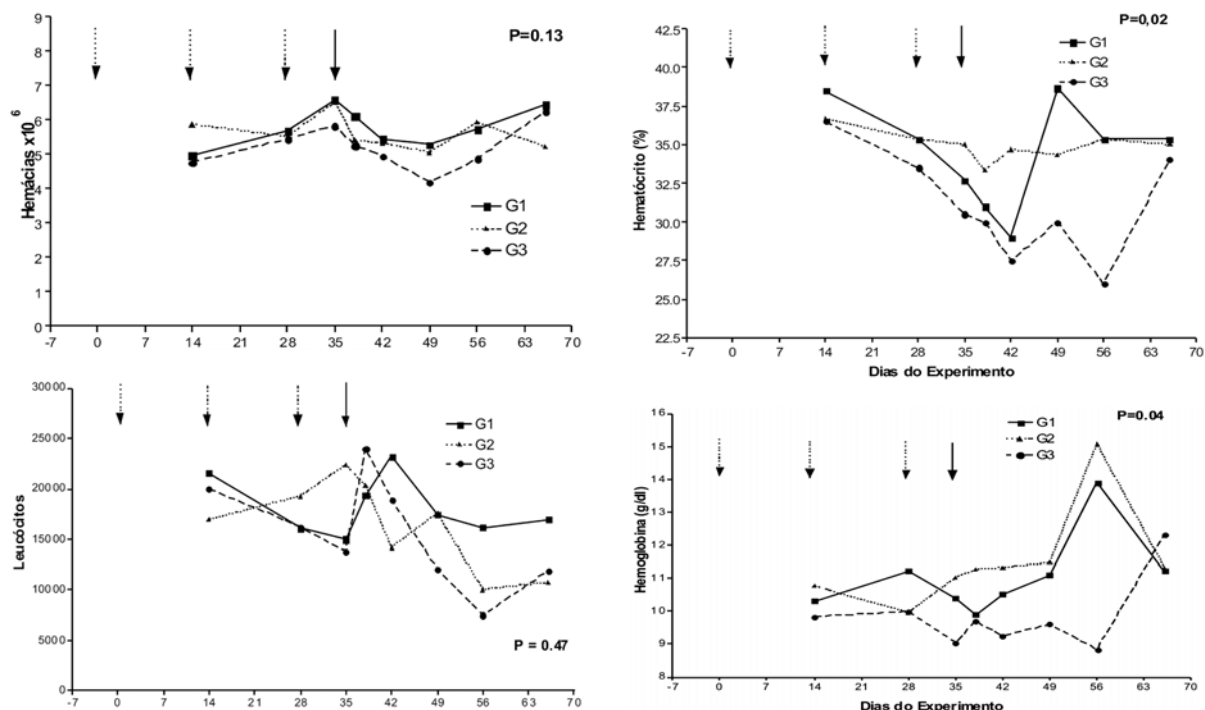


Figura 2. Média dos valores do hemograma obtida semanalmente dos suínos dos três grupos experimentais. As setas pontilhadas indicam a aplicação da β -glucana (G1) e a seta contínua indica o dia de infecção. Os animais (G1 e G2) foram infectados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular. Os animais do G3 eram controle negativo. O $P \leq 0,05$ indica significância estatística.

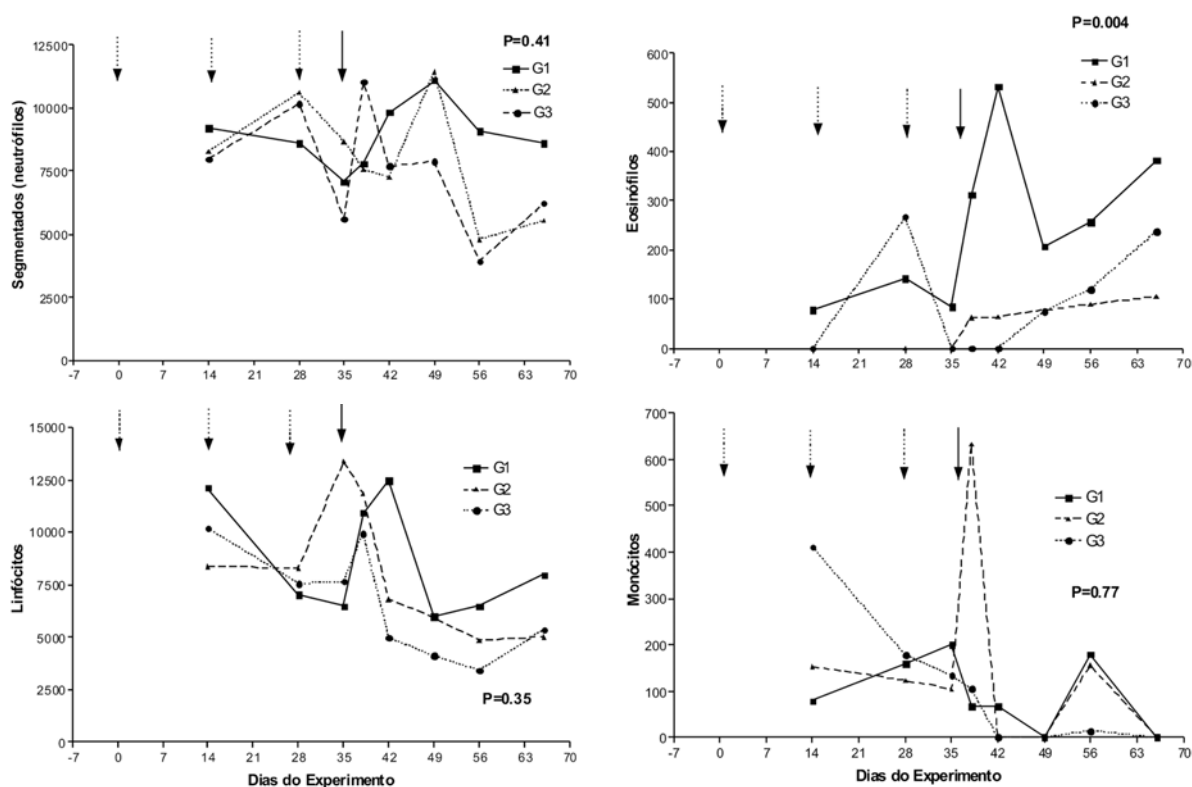


Figura 3. Média dos valores das contagens diferenciais dos leucócitos obtida semanalmente dos suínos dos três grupos experimentais. As setas pontilhadas indicam a aplicação da β -glucana (G1) e a seta contínua indica o dia de infecção. Os animais (G1 e G2) foram infectados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular. Os animais do G3 eram controle negativo. O $P \geq 0,05$ indica significância estatística.

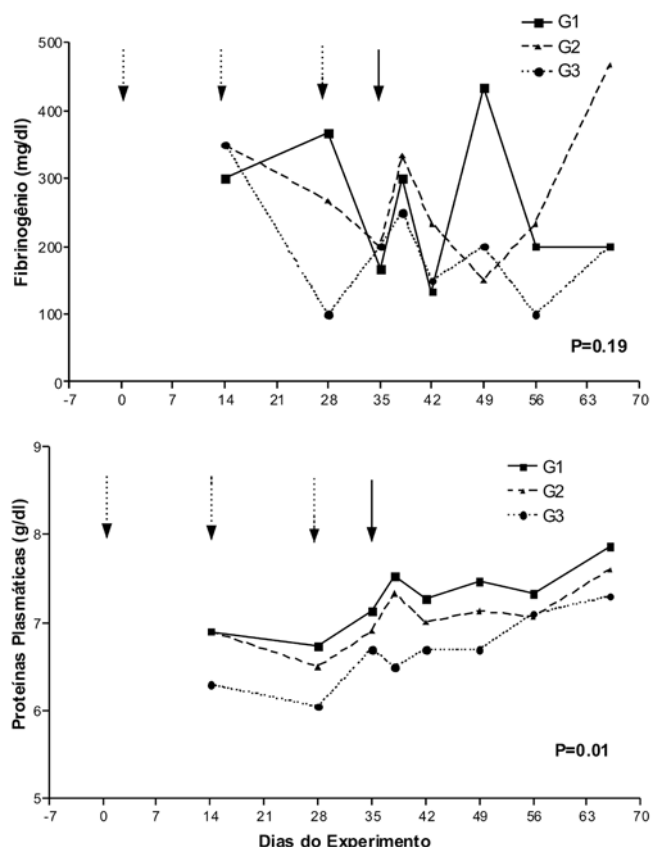


Figura 4. Média dos valores das dosagens do fibrinogênio e proteína plasmática obtida semanalmente dos suínos dos três grupos experimentais. As setas pontilhadas indicam a aplicação da β -glucana (G1) e a seta contínua indica o dia da infecção. Os animais (G1 e G2) foram infectados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular. Os animais do G3 eram controle negativo. O $P \geq 0,05$ indica significância estatística.

Resposta imune humoral

A cinética do nível de anticorpos do G1 e G2 é mostrada na Figura 5. Todos os suínos do G1 e G2 soro converteram aos sete dpi. A média dos títulos de anticorpos dos suínos do G1 ($\text{IFI-log}_{10}=2,55 \pm 0,15$) não diferiu ($P=0,9$) da média G2 ($\text{IFI-log}_{10}=2,66 \pm 0,15$). Os suínos do G3 permaneceram negativos durante todo o experimento. Todas as amostras de humor aquoso e humor vítreo dos suínos, dos três grupos, foram negativas pela IFI.

Sensibilidade da PCR

A PCR usada nas condições do experimento foi capaz de detectar o equivalente de DNA de *T. gondii* na concentração de 10 taquizoítos/mL (Figura 6).

Avaliação da parasitemia (ensaio biológico em camundongos e PCR)

Os resultados da parasitemia obtidos pelo ensaio biológico e a PCR estão na Tabela 2. No G1 o suíno I foi o único positivo no ensaio biológico, sendo detectada há positividade 14 dias pós-inoculação (dpi). No G2 os 3 animais apresentaram positividade no ensaio biológico; sendo os suínos V e VI

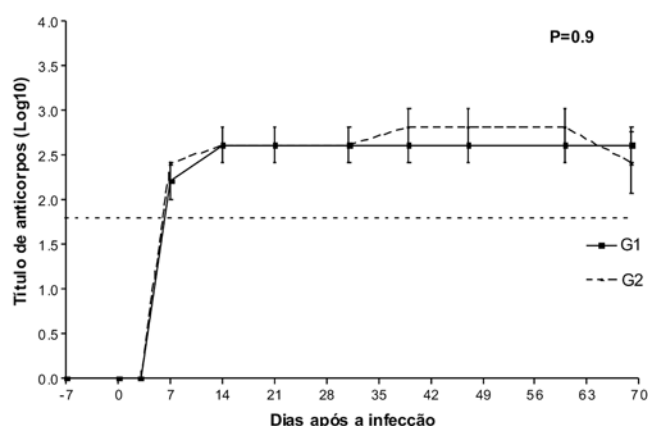


Figura 5. Cinética do título de anticorpos dos suínos dos grupos 1 e 2. Os animais foram infectados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* pela via intramuscular no dia 0. A linha pontilhada representa o ponto de corte ($\text{Log}_{10}=1,80$). O $P \geq 0,05$ indica significância estatística.

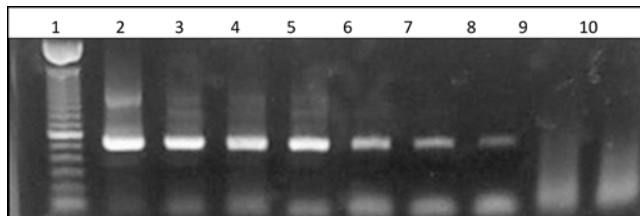


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 2%, de amostras de taquizoítos diluídos: teste de sensibilidade de 529 pb da PCR. Canaleta 1: Padrão molecular. Canaletas de 2 a 10 representam a diluição: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} de taquizoítos/mL, respectivamente.

Tabela 2. Resultado do bioensaio e da PCR, do sangue de suínos, realizado a partir do terceiro dia após o desafio. O desafio dos animais (G1 e G2) foi realizado com 10^7 taquizoítos da cepa RH, os animais do G3 permaneceram como grupo controle negativo.

Suínos		Dias após a infecção							
		3	7	14	21	31	39	47	69
G1	I	-	-	P _b	-	-	-	P _p	-
	II	P _p	-	-	-	-	-	P _p	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	IV	-	-	-	-	-	P _p	P _b	-
	V	P _b	-	-	-	-	-	P _p	-
	VI	P _b	-	-	-	P _p	-	-	-
G3	VII	-	-	-	-	-	-	-	-
	VIII	-	-	-	-	-	-	-	-

P_b = Positivo bioensaio; P_p = Positivo PCR.

positivos no 3º dpi e o IV positivo no 47 dpi. Com relação à PCR o suíno II do G1 foi positivo no 3º dpi e os suínos I e II aos 47 dpi. E no G2 os suínos VI, IV e V foram positivos pelo PCR aos 31, 39 e 47 dpi, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas entre os 2 testes estudados (PCR x ensaio biológico, $P=0,33$) e entre os dois grupos (G1 x G2, $P=0,3$). Os dois animais do G3 apresentaram resultados negativos para a parasitemia tanto no ensaio biológico como na PCR durante todo o experimento.

Avaliação ocular e digestão péptica

Todas as amostras de retina e pool muscular (produto da digestão péptica) dos animais do G1, G2 e G3 apresentaram resultados negativos nas provas de ensaio biológico e PCR.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a ação da β -glucana pela via intramuscular em suínos infectados experimentalmente com taquizoítos (cepa RH) do *T. gondii*. Com exceção dos eosinófilos, o resultado da contagem diferencial de leucócitos sanguíneos nos animais do G1, quando comparados aos do G2 e G3 não foram significativos. Fogelmark et al. (2001) relataram eosinofilia no interstício pulmonar, no lavado pulmonar e no epitélio das vias aéreas de porquinhos da índia expostos a inalação diária de β -glucana. No entanto, o aumento de eosinófilos do G1 observados no presente trabalho ocorreu sete dias após a infecção. Dritz et al. (1995) não verificaram diferenças significativas no número ou na função de macrófagos e de neutrófilos em leitões desmamados que receberam β -glucana pela alimentação. Além disto, Rylander e Holt (1998) também não verificaram diferenças significativas no número dos leucócitos (neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos) de cobaias que receberam β -glucana pela via nasal. Vidotto et al. (1987) observaram eosinopenia em porcas gestantes do terceiro ao nono dia após a infecção com oocistos da cepa AS-28 do *T. gondii*; atribuindo a esses achados uma possível ação do *T. gondii*. No presente estudo a β -glucana, possivelmente, melhorou a resposta dos eosinófilos, visto que foram os únicos leucócitos que apresentaram diferenças entre os animais do G1 com os do G2 e G3.

No presente estudo, três dias após a infecção (dia 38) houve uma diminuição no número de neutrófilos nos animais infectados (G1 e G2), quando comparados aos não infectados (G3). Embora não tenha sido observada nenhuma diferença estatística entre os grupos, essa diminuição poderia estar relacionada à fase aguda da infecção e ser causada pela migração ou diapedese dos neutrófilos para os tecidos infectados. Após a inoculação IM, a cepa RH é disseminada para outros tecidos de suínos (DUBEY et al., 1994). Além disto, Vidotto et al. (1987) também observaram neutropenia em porcas infectadas experimentalmente. As glucanas têm sido descritas como estimuladoras das respostas imune celular e humoral (CHEN; AINSWORTH, 1992; YUN et al., 1997). Elas possuem um efeito antiinflamatório por inibirem citocinas pró-inflamatórias (HOGABOAM et al., 1998). Outras atividades biológicas também têm sido relacionadas às β -glucanas, tal como, estimulação da hematopoiese, ativação de macrófagos e neutrófilos (RANKIN et al., 1990; HOFER; POSPISIL, 1997; TSIAPALI et al., 2001).

Hiss e Sauerwein (2003) não encontraram eficiência na resposta imune específica (humoral e celular) após a administração da β -glucana pela via oral em suínos vacinados com o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (VSRRS). Por outro lado, Xiao et al. (2004) relataram um aumento na produção de interferon gama (IFN- γ) em suínos

de quatro meses tratados com β -glucana solúvel e desafiados com o VSRRS, sendo que a produção de IFN- γ não foi antígeno dependente. Camundongos tratados com β -glucana extraída da aveia e inoculados com *Eimeria vermiformis* apresentaram altos níveis de anticorpos específicos e resposta celular significativa em relação aos camundongos não tratados (YUN et al., 2003). No mesmo estudo a β -glucana extraída da aveia induziu a sobrevivência prolongada de camundongos desafiados com 5×10^8 de *Staphylococcus aureus*. Li et al. (2005) observaram resultados que indicam um aumento da resposta imune específica (produção de anticorpos), apenas na primeira semana, em suínos desmamados e tratados via alimentação com β -glucana extraída do *S. cerevisiae*.

Os valores do hematócrito e da hemoglobina não foram conclusivos, uma vez que não houve diferenças entre o G1 e G2. Considerando os valores da proteína plasmática (PP) verificou-se que os animais do G1 sempre apresentaram valores mais elevados que os outros dois grupos durante todo o experimento. No entanto, os dois grupos infectados (G1 e G2) tiveram um aumento na concentração de PP três dias após a infecção por *T. gondii*. As proteínas plasmáticas são classificadas como proteínas de fase aguda, pois, podem apresentar um aumento na sua síntese pelas células do fígado em decorrência de processos inflamatórios ou infecciosos (SILVA et al., 2005). O fator de necrose tumoral e as interleucinas 1 e 6 também são responsáveis pelo aumento das PP, e segundo Silva et al. (2005) seria mais prático e confiável medir a concentração dessa última do que das PP.

A β -glucana não se mostrou eficiente na melhora da resposta imune humoral, pois, a média dos títulos de anticorpos entre os grupos não se diferenciaram. Freire et al. (2003) verificaram títulos de anticorpos, em suínos inoculados pela via intramuscular com a cepa RH (1ª dose 10^5 ; 2ª dose 10^7), semelhantes aos encontrados no presente trabalho, porém, esses títulos só foram obtidos após a segunda dose de taquizoítos vivos.

A cepa RH é o isolado de *T. gondii* mais comumente utilizada e estudada em laboratórios. Essa cepa foi isolada em 1939 por Sabin (1941) de um caso de encefalite toxoplásmica fatal em uma criança. Desde então, ela vem sendo propagada em cultivo celular e em camundongos. A cepa RH tem sido descrita como não persistente nos tecidos de suínos, por mais de 64 dias, e inclusive indicada como uma alternativa vacinal para os mesmos (WORK et al., 1970; DUBEY et al., 1991).

Cistos de *T. gondii* não foram demonstrados em suínos aos 42 e 64 dpi com a cepa RH (DUBEY et al., 1991). Porém, Pinckney et al. (1994) recuperaram a cepa RH dos tecidos de suínos infectados experimentalmente pela via intravenosa. No presente experimento, todos os animais dos grupos um e dois apresentaram sinais clínicos leves, caracterizados basicamente por tosse e secreção ocular, acompanhados de leve hipertermia. Dubey et al. (1991) verificaram apenas a febre com sinal clínico em suínos infectados pela via subcutânea com 10^6 taquizoítos da cepa RH. Por outro lado, Pinckney et al. (1994) descreveram sinais clínicos severos em leitões infectados pela

via intravenosa. Da mesma forma, Garcia et al. (2005) inocularam pela via intramuscular leitões com taquizoítos da cepa RH e verificaram sinais semelhantes aos do presente trabalho, porém, esses apresentaram temperaturas corporais mais elevadas. Essas diferenças poderiam estar relacionadas à maior dose infectante utilizada (7×10^7) por Garcia et al. (2005) e pela via de inoculação diferentes utilizada por Dubey et al. (1991) e Pinckney et al. (1994). Dubey et al. (1994) inocularam suínos com 10^5 taquizoítos da cepa RH pela via intramuscular e intravenosa. Os animais inoculados pela via intramuscular apresentaram somente febre, já os animais inoculados pela via intravenosa adoeceram e/ou morreram.

Vários fatores podem influenciar os sinais clínicos da toxoplasmose tais como a espécie animal, a idade, características da cepa (inclusive linhagem), estágio do parasita, via da infecção, estado nutricional e outras infecções (BEKNER DA SILVA et al., 1994; DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1994).

Pinckney et al. (1994) verificaram conjuntivite, ulcerações e coriorretinite oculares em suínos após 7, 9, 14 e até mesmo 60 dias após a infecção pela via intravenosa com a cepa RH. *Toxoplasma gondii* foi detectado na retina de suínos, inoculados pela via oral com oocistos da cepa AS-28, tanto pelo ensaio biológico como pela nested PCR (YAI et al., 2003). Mais recentemente, Garcia et al. (2007) detectaram anticorpos em humor aquoso e DNA do *T. gondii* pela PCR na retina de suínos infectados experimentalmente pela via oral com oocistos da cepa VEG. Estes autores detectaram baixos títulos de anticorpos no humor aquoso pela IFI (maior título de 128 em apenas um animal) 60 dias após a infecção e 3 (30%) amostras positivas na PCR.

No presente estudo não foram detectados anticorpos contra o *T. gondii* pela IFI de humor aquoso e vítreo, bem como DNA do parasita em todas as retinas avaliadas pela PCR e ensaio biológico. Portanto, o que parece ser um fator importante, independentemente da idade, é a via de inoculação, sendo a via intravenosa mais patogênica que as outras.

Os resultados observados nesse trabalho confirmam as observações realizadas anteriormente quando se descreveu diferença entre linhagens da cepa RH entre laboratórios (HOWE; SIBLEY, 1994). O fato é que algumas cepas RH podem causar toxoplasmose severa em suínos enquanto outras não (DUBEY et al., 1994). Outra observação importante é que após cerca de 50 anos de cultivo as linhagens da cepa RH podem apresentar variações genéticas (HOWE; SIBLEY, 1994).

O ensaio biológico em gatos deve ser considerado a prova padrão para detectar parasitas de tecidos de animais de consumo (HILL et al., 2006), porém, ela é demasiadamente trabalhosa, cara, muito demorada e perigosa para os manipuladores (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). O uso de camundongos no ensaio biológico é aceitável, na avaliação de cistos teciduais (VIDOTTO; COSTA, 1987; NAVARRO et al., 1992; DIAS et al., 2005; GARCIA et al., 2005; GARCIA et al., 2006b), e prova padrão para avaliação da parasitemia por *T. gondii* (COSTA et al., 1977; VIDOTTO;

COSTA, 1987; KANETO et al., 1997). Garcia et al. (2006b), bem como, Tsutsui et al., (2007) verificaram um melhor resultado do ensaio biológico com relação à PCR em amostras de carnes de suínos inoculados com oocistos da cepa VEG.

A PCR é amplamente utilizada para avaliar a presença de DNA do parasita em vários fluidos, sangue e tecidos (CHABBERT et al., 2004). A PCR tem a vantagem de ser um teste rápido e mais barato que o ensaio biológico, porém não detecta o parasita vivo (GARCIA et al., 2006b).

Paugam et al., (1995) detectaram pela PCR de sangue de camundongos, amostras positivas do 2º até o 21º dia após a inoculação de uma cepa avirulenta de *T. gondii*. Já em cães avaliados pelo ensaio biológico foi possível detectar surtos parasitêmicos de *T. gondii* pela inoculação de taquizoítos da cepa RH aos 7 e 35 dias após a inoculação (ARANTES, 2005). A cepa RH é considerada uma cepa não persistente, porém, o fígado, até o 14º dpi, seria o local da multiplicação e/ou destruição do parasita, não sendo mais isoladas nos dias 52, 57 e 76 dpi dos tecidos suínos (DUBEY et al., 1994).

Verificou-se no presente trabalho que dois suínos do G1 e todos os animais do G2 tiveram *T. gondii* detectado no sangue do 3º até o 47º dpi, porém, nenhum organismo foi detectado no sangue e tecidos dos suínos no dia do abate. O fígado ou o baço poderiam ser um dos locais de permanência do parasita durante a fase de parasitemia, porém, outros trabalhos devem ser realizados para avaliar essa possibilidade.

Os resultados observados no presente estudo não revelaram qualquer ação da β -glucana na infecção por taquizoítos do *T. gondii*, considerando a forma como foi utilizada. A linhagem da cepa RH utilizada se mostrou de baixa patogenicidade e acistogênica (músculos e retina) para suínos 69 dpi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, T.P. *Transmissão sexual do Toxoplasma gondii (Nicolle & Manceaux, 1909) em cães (Canis familiaris)*. 2005. 83f Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univesidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- BECKNER DA SILVA, A.C.; MITSUKA, R.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; JANKEVICIUS, S.I.; VIDOTTO, O.; JANKEVICIUS, J.V. Avaliação pela imunofluorescência indireta dos aspectos imunogênicos e antigênicos de diferentes amostras de *Toxoplasma Gondii* inoculadas em suínos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 3, n. 1, p. 17-22, 1994.
- BROWDER, I.W.; WILLIAMS, D.L.; KITAHAMA, A.; DI LUZIO, N.R.; Modification of post-operative *C. albicans* sepsis by glucana immunostimulation. *International Journal of Immunopharmacology*, v. 6, n. 1, p. 19-26, 1984.
- CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 6, n. 3, p. 117-118, 1964.
- CHABBERT, E.; LACHAUD L.; CROBU L.; BASTIEN P.

- Comparison of Two Widely Used PCR Primer Systems for Detection of *Toxoplasma* in Amniotic Fluid, Blood, and Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 4, p. 1719-1722, 2004.
- CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Disease*, v. 15, n. 4, p. 295, 1992.
- COSTA, A.J.; ARAUJO, F.G.; COSTA, J.O.; LIMA, J.D.; NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, v. 63, n. 2, p. 212-218, 1977.
- DI LUZIO, N.R.; WILLIAMS, D.L.; MCNAMEE, R.B.; EDWARDS, B.F.; KITAHAMA, A. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucana. *International Journal of Cancer*, v. 24, n.6, p. 773-779, 1979.
- DIAS, R.A.F.; NAVARRO, I.T.; RUFFOLO, B.B.; BUGNI, F.M.; CASTRO, M.V.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, n. 4, p. 185-189, 2005.
- DRITZ, S.S.; SHI, J.; KIELIAN, T.L.; GOODBAND, R.D.; NELSEN, J.L.; TOKACH, M.D.; CHENGAPPA, M.M.; SMITH, J.E.; BLECHA, F. Influence of Dietary β -Glucan on Growth Performance, Nonspecific Immunity, and Resistance to *Streptococcus suis* Infection in Weanling Pigs. *Journal of Animal Science*, v. 73, n. 11, p. 3341-3350, 1995.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 205, n.11, p. 1593-1598, 1994.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*, v. 74, n. 1, p. 75-77, 1998.
- DUBEY, J.P.; URBAN, J.F.; DAVIS, S.W. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 52, p. 1316-1319, 1991.
- DUBEY, J.P.; BAKER, D.G.; DAVIS, S.W.; URBAN, J.F.; SHEN, S.K. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 982-987, 1994.
- DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology*, v. 84, n. 4, p. 749-752, 1998.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S.W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Veterinary Parasitology*, v. 86, n. 3, p. 155-178, 1999.
- FOGELMARK, B.; THORN, J.; RYLANDER, R. Inhalation of (\rightarrow)- β -D-glucan causes airway eosinophilia. *Mediators of Inflammation*, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.
- FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; GENNARI, S.M. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (iscoms). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 4, p. 388-396, 2003.
- GARCIA, J.L.; GENNARI, J.L.; NAVARRO, I.T.; MACHADO, R.Z.; SINHORINI, I.L. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. *Experimental Parasitology*, v. 108, n. 1-2, p. 40-46, 2004.
- GARCIA, J.L.; GENNARI, J.L.; NAVARRO, I.T.; MACHADO, R.Z.; SINHORINI, I.L.; FREIRE, R.L.; MARANA, E.R.M.; TSUTSUI, V.; CONTENTE, A.P.A.; BEGALE, L.P. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, v. 129, n. 3-4, p. 209-217, 2005.
- GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MACHADO, R.Z.; LUZ PEREIRA, A.B.; SINHORINI, I.L. *Toxoplasma gondii*: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*, v. 113, n. 2, p. 100-105, 2006a.
- GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MACHADO, R.Z. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*, v. 113, n. 4, p. 267-271, 2006b.
- GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; NAVARRO, I.T.; MACHADO, R.Z.; HEADLEY, S.A. VIDOTTO, O.; GUIMARÃES, J.S.; BUGNI, F.M.; IGARASHI, M. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Research in Veterinary Science*, v. 82, n.2, p. 237-242, 2007.
- GOLDMAN, R.; JAFFE, C.L. Administration of β -glucan following *Leishmania major* infection suppresses disease progression in mice. *Parasite Immunology*, v. 13, n. 2, p. 137-145, 1991.
- HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K.; GAMBLE, H.R. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary Parasitology*, v. 141, n. 1-2, p. 9-17, 2006.
- HISS, S.; SAUERWEIN, H. Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*, v. 87, n. 1-2, p. 2-11, 2003.
- HOFER, M.; POSPISIL, M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice: a survey of the authors results. *International Journal of Immunopharmacology*, v. 19, n. 6-7, p. 607-609, 1997.
- HOGABOAM, C.M.; STEINHAUSER, M.L.; SCHOCK, H.; LUKACS, N.; STRIETER, R.M.; STANDIFORD,

- T.; KUNKEL, S.L. Therapeutic Effects of Nitric Oxide Inhibition during Experimental Fecal Peritonitis: Role of Interleukin-10 and Monocyte Chemoattractant Protein 1. *Infectious and Immunology*, v. 66, n. 2, p. 650-655, 1998.
- HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DEBRAEKELEER, J. 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.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii*: Analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. *Experimental Parasitology*, v. 78, n. 2, p. 242-245, 1994.
- JACOBS, D.; DUBREMETZ, J-F.; LOYENS, A.; BOSMAN, F.; SAMAN, E. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 91, n. 2, p. 237-249, 1998.
- KANETO, C.N.; COSTA, A.J.; PAULILLO, A.C.; MORAES, F.R.; Murakami, T.O.; M.V. MEIRELES, M.V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Veterinary Parasitology*, v. 69, n. 2, p 203-210, 1997.
- LI, J.; XING, J.; LI, D.; WANG, X.; ZHAO, L.; SONGQIAO, L.V.; HUANG, D. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned piglets. *Archives of Animal Nutrition*, v. 59, n. 5, p.303-312, 2005.
- NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L.; *Toxoplasma gondii*: Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, Pr. *Semina*, v. 13, n. 1, p. 15-18, 1992.
- OLIVEIRA, R.J.; MATUO, R.; SILVA, A.F.; MATIAZI, H.J.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R.; Protective effect of α -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology In Vitro*, v. 21, n. 1, p.41-52, 2007.
- PAUGAM, A.; DUPOUY-CAMET, J.; SUMUYEN, M.H.; ROMAND, S.; LAMORIL, J.; DEROUIN, F. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. *Parasite*, v. 2, n. 2, p. 181-184, 1995.
- PINCKNEY, R.D.; LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; BOOSINGER, T.R.; MCLAUGHLIN, S.A.; DUBEY, J.P.; Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, v. 80, n. 3, p. 438-448, 1994.
- RANKIN, A.J., SYLVESTER, I., SMITH, S., YOSHIMURA, T., LEONARD, E.J. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *Journal of Clinical Investigation*, v. 86, n. 5, p. 1556-1564, 1990.
- RYLANDER, R.; HOLT, P.G. (1'! (1'Ç° □3)- α -D-Glucan and endotoxin modulate immune response to inhaled allergen. *Mediators of Inflammation*, v. 7, p. 105-110, 1998.
- SABIN, A.B. Toxoplasmosis encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association*, v. 16, p. 801-807, 1941.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed., v.2, Cold. Spring. Harbor: Laboratory Press, 1989. p.14.1-14.35.
- SILVA, D.G.K.C.; TEODORO, G.M.; DE SENA, L.V.; DE SOUSA, Z.M.; REZENDE, A. A. Perfil Eletroforético de Proteínas Plasmáticas: Estudo em Crianças Atendidas no Hospital de Pediatria – Hosped / UFRN da Cidade de Natal-RN. *Revista Brasileira de análises Clínicas*, v. 37, n. 4, p. 239-242, 2005.
- SUPHANTHARIKA, M.; KHUNRAE, P.; THANARDKIT, P.; VERDUYN C. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresource Technology*, v. 88, n. 1, p. 55-60, 2003.
- TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBXEISCH, J.; ENSLEY, H.E.; BROWDER, I.W.; WILLIAMS, L.D. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biological Medicine*, v. 30, n. 4, p. 393-402, 2001.
- TSUTSUI, V.S.; FREIRE, R.L.; GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; VIEIRA, D.P.; MARANA, E.R.M.; PRUDENCIO, L.B.; NAVARRO, I.T. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 1, p. 30-34, 2007.
- VACHA, J.; ZNOJIL, V.; POSPISIL, M.; HOLA, J.; PIPALOVA, I. Microcytic anemia and changes in ferrokinetics as late after-effects of glucan administration in murine hepatitis virus-infected C57BL/10ScSnPh mice. *International Journal of Immunopharmacology*, v. 16, n. 1, p. 51-60, 1994.
- VIDOTTO, O.; COSTA, J.C.; BALARIN, M.R.S.; ROCHA, M.A. Toxoplasmosis experimental em porcas gestantes. I. Observações clínicas e hematológicas. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 39, n. 4, p. 623-639, 1987.
- WORK, K.; ERIKSEN, L.; FENNESTAD, K.L. Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, v.78, p. 129-139, 1970.
- XIAO, Z.; TRINCADO, C.A.; MURTAUGH, M.P. β -Glucan enhancement of T cell IFN- γ response in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 102, n.3, p. 315-320, 2004.
- YAI, L.E.O.; VIANNA, M.C.B.; SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R.L.; RICHTZNHAIN, L.; GENNARI, S.M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 40, n. 3, p. 227-234, 2003.

YUN, C.H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; GAJADHAR, A.A.; REDMOND, M.J.; LARRVELD, B. β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. *International Journal for Parasitology*, v. 27, n. 3, p. 329–337, 1997.

YUN, C.H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; PARK, B.C.; LAARVELD, B. β -glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections. *FEMS Immunological and Medical Microbiology*, v. 35, n. 1, p. 67–75, 2003.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.