Nahiara Esteves Zorgi

IMUNIDADE HUMORAL DE CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6J IMUNIZADOS COM TAQUIZOÍTOS DE *Toxoplasma gondii* IRRADIADOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Nahiara Esteves Zorgi

IMUNIDADE HUMORAL DE CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6J IMUNIZADOS COM TAQUIZOÍTOS DE *Toxoplasma gondii* IRRADIADOS.

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno - Hospedeiro

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

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zorgi, Nahiara Esteves.
Imunidade humoral de camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados / Nahiara Esteves Zorgi. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Heitor Franco de Andrade Junior

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Estudo da resposta imunológica em camundongos imunizados, por via oral e/ou intraperitoneal, com taquizoítos de *T. gondii* irradiados.

Versão do título para o inglês: Humoral immunity in BALB/c and C57Bl/6j mice immunized with irradiated tachyzoite of *Toxoplasma gondii*.

Descritores: 1. *Toxoplasma gondii* 2. Radiação ionizante 3. Memória imunológica 4. Anticorpos de alta avidez 5. Baço 6. Medula óssea I. Andrade Junior, Heitor Franco de II. Universidade de São Paulo.Instituto de Ciências Biomédicas.Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB0172/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nahiara Esteves Zorgi.

Título da Dissertação: Imunidade humoral de camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados.

Orientador(a): Heitor Franco de Andrade Jr.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **110** nas fls. **62** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Heitor Franco de Andrade Jr, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Relações entre a resposta imune humoral e a resposta imune celular na vacinação experimental de camundongos por taquizoítos irradiados***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Nahiara Esteves Zorgi e o pesquisador Andrés Jimenez Galisteo Jr*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **01.12.08,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 02 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedico esse trabalho, em especial

aos meus pais, Márcio e Sandra,

por todo carinho e paciência durante

a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr.º Heitor Franco de Andrade Jr**., pela oportunidade, orientação, dedicação, ensinamentos, críticas e elogios durante a realização desse trabalho;

Ao **Dr.º Andrés Jimenez Galisteo Jr,** pela orientação durante a iniciação científica, os primeiros ensinamentos, sugestões, críticas durante a realização desse trabalho e ajuda na revisão do texto;

À **Andréa Costa**, pela colaboração na parte experimental, companhia durante a realização do trabalho e principalmente pela amizade;

À **Francisca Lucio de Oliveira, *"in memorian",*** por arrumar e limpar toda a minha bagunça durante a realização dos experimentos;

Á **Roselaine Pereira Alvim Cardoso,** pela amizade e boas conversas, e principalmente pela colaboração durante a realização desse trabalho;

Á **Solange Fernandes Ferreira dos Santos,** pelo carinho, amizade e por sempre estar disposta a ajudar;

Ao **Luciano Monteiro da Silva,** por sempre estar disposto a ajudar e no auxilio na compra dos reagentes;

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia do IMTSP: **Bárbara Fialho Carvalho, Bruna Macedo, Camila Aparecida de Carvalho, Diego Petena Moretti, Felipe Pessoa de Melo Hermida, Ivani José da Silva, Janaina Baptista Alves; Juliana Nunes Mecca, Jaqueline Polizeli Rodrigues, Luciana Regina Meireles, Maria Aparecida Moraes Marciano**, **Marina Cortez Demicheli e Vanessa Rodrigues da Silva** pela amizade, companhia, boas conversas, risadas e os momentos de descontração;

Às secretarias, **Ângela M. C. de Jesus e Wilma Garcia**, da pós-graduação da parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, por ajudar na parte burocrática do projeto;

À **Dr.ª Maria Notomi Sato,** por ceder o laboratório para aprendizado de alguns ensaios e a doação de reagentes e principalmente pelas sugestões no trabalho durante a qualificação;

Ao **Laboratório Investigação em Dermatologia e Imunodeficiência (LIM56),** pela oportunidade de acompanhar os experimentos para novas aprendizagens;

Ao **Orlando Guerra Piubelli,** pelos ensinamentos, acompanhamento dos ensaios e pelas dicas sugeridas;

À **Dr.ª Silvia Beatriz Boscardin** e **Dr.º José Maria Alvarez Mosig,** pelas sugestões durante a qualificação;

Ao **laboratório da Dr.ª Eufrosina S. Umezawa**, por ceder alguns equipamentos utilizados nesse trabalho;

À **Dr.ª Silvia Reni Bortolin Uliana,** pelos ensinamentos durante a realização do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À minha família **Márcio Zorgi, Sandra Regina Esteves Zorgi, Michele Esteves Zorgi, Leonardo Esteves Zorgi, Gustavo Zorgi Martinez** e **Júlia Zorgi Martinez**, pelo carinho.

Ao meu namorado, **Fábio Leoncio Recacho,** pelo carinho, amor e paciência durante a realização desse trabalho;

Ao **José Recacho e Ermínia Recacho**, pela torcida e carinho;

Aos amigos **Érika Rodrigues, Amanda de Fátima Carvalho, Ariane Campos Gouvêa, Mariana Salvador Marchi, Andréia Suemi Uheara, Cintia Alves, Luís Carlos Chagas,** pela amizade e carinho;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (Capes) pelo apoio financeiro;

À **Deus**, pela vida.

Agradeço todas as pessoas que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste projeto.

A todos muito obrigado!!!

Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa inspiração maior. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!

Mário Quintana

RESUMO

Zorgi NE. Imunidade humoral de camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo; 2010.

A toxoplasmose é uma doença altamente disseminada, afetando um quinto da população humana. *T.gondii* apresenta um ciclo de vida complexo que envolve os gatos e os hospedeiros de sangue quente, incluindo o homem. Vacinas de componente são imunógenos geralmente pobres e vacinas viva atenuada causam a doença crônica no hospedeiro. Taquizoítos de *T. gondii* irradiados a uma dose de 255Gy não causam infecção no hospedeiro e induzem uma imunidade similar da infecção natural. Desafio de animais imunizados resultou em proteção parcial, sem estudos sobre memória imunológica. Neste trabalho nós estudamos a produção *in vitro* de IgG por células do baço e medula óssea de camundongos isogênicos imunizados por via intraperitoneal ou por via oral com taquizoítos irradiados, comparando com os animais cronicamente infectados. Celulas do baço e medula óssea foram isoladas dos animais e, após crescimento *in vitro,* a produção total de anticorpos específicos por ELISA ou a produção de anticorpos de alta afinidade, após tratamento caotrópico. A proteção foi medida pelo número de cistos cerebrais, um mês após o desafio com três cepas diferentes. Todos os modelos imunizados apresentaram anticorpos IgG específicos no soro. Após quatro dias de cultivo *in vitro*, as células da medula óssea e baço claramente produziram anticorpos específicos semelhante à infecção crônica em camundongos imunizados por via intraperitoneal, superior aos animais imunizados por via oral. A medula óssea contém um maior número de células produtoras de anticorpos IgG específicos do que o baço. A maioria dos anticorpos específicos são de alta afinidade em todas as imunizações, diverso do soro que apresentaram baixo percentual de avidez de IgG elevados. Os resultados preliminares mostram também a presença de anticorpos específicos IgA nas fezes. Todas as vacinas indutoras de proteção parcial contra o desafio, que foi mais evidente em alta patogenicidade da cepa ME-49. A protecção evidenciada foi proporcional tanto à quantidade de anticorpos IgG no soro ou produzidos pelas células da medula óssea, após longos períodos de cultura. Nossos dados demonstram claramente que a quantidade de anticorpos de alta afinidade está relacionada com a sobrevida específica de memória celular, principalmente na medula óssea. A imunização com taquizoítos irradiados é um bom modelo de vacinação contra a toxoplasmose experimental, independentemente do desafio cepa do parasita.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*. Radiação ionizante. Memória imunológica. Anticorpos de alta avidez. Baço. Medula óssea.

ABSTRACT

Zorgi NE. Humoral immunity in BALB/c and C57Bl/6j mice immunized with irradiated tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. [Master Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo; 2010.

Toxoplasmosis is a highly disseminated infection, affecting one fifth of the human population. *T.gondii* presented a complex life cycle involving cats and warm blood hosts, including man. Component vaccines are usually poor immunogens and living attenuated vaccines cause chronic disease in the host. 255Gy irradiated tachyzoites do not cause infection in the host and induce the same immunity as natural infection. Challenge of immunized animals resulted in partial protection, without studies on immunological memory. Here, we studied in vitro production of specific IgG by cells from spleen and bone marrow of isogenic mice immunized parenterally or *per os* with irradiated tachyzoites, comparing with chronically infected animals. Spleen and bone marrow cells were isolated from those animals and, after *in vitro* growth, the production specific antibodies were measured by ELISA, total or high affinity, after chaotrope treatment. Protection was measured by numbers of brain cysts, one month after challenge with three different strains. All immunized models presented specific IgG in their serum. After four days *in vitro* growth, bone marrow and spleen cells clearly produced specific IgG similar as chronic infection in parenterally immunized mice, higher than *per os* immunized animals. Bone marrow contains larger numbers of specific IgG producing cells than spleen. Most of the specific antibodies were of high affinity in all immunizations, diverse from serum which presented low proportion of high avidity IgG. Preliminary results show also presence of specific IgA antibodies in stools. All immunizations induce partial protection against challenge, which was more evident in highly pathogenic ME-49 strain. The protection evidenced was proportional both to the amount of IgG antibodies in serum or produced by bone marrow cells, after longer culture periods. Our data clearly shows that the amount of high affinity antibodies is related to specific memory cell survival, especially in bone marrow. Immunization with irradiated tachyzoites is a good vaccination model for experimental toxoplasmosis, regardless of challenging parasite strain.

Keywords: *Toxoplasma gondii.* Ionizing radiation. Immunologic memory. Antibodies high avidity. Spleen. Bone marrow.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia esquemática de *T. gondii*..... **35**

Figura 2 - Ciclo de vida do *T. gondii,* com suas formas de infecção para o homem..... **39**

Figura 3 - Detecção de anticorpos IgG total em soro dos animais imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral..... **51**

Figura 4 - Detecção de anticorpos IgG de alta afinidade no soro dos animais imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral..... **52**

Figura 5 - Detecção de anticorpos IgA no soro dos animais imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral..... **53**

Figura 6 - Produção de anticorpos S-IgA nas fezes dos animais imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral..... **54**

Figura 7 - Detecção de anticorpos IgG por células da medula óssea e por células esplênicas em camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral..... **56**

Figura 8 - Detecção de anticorpos IgG total e de alta afinidade por células da medula óssea e do baço em camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral..... **58**

Figura 9 - Números de cistos teciduais de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral e desafiados com 10 cistos de cada cepa. Proporção de infecção em cepa ME-49, cepa P e cepa VEG..... **59**

Figura 10 - Números de cistos teciduais de camundongos C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal e por via oral e desafiados com 10 cistos de cada cepa. Proporção de infecção em cepa ME-49, cepa P e cepa VEG..... **61**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da proteção qualitativa, ou seja, ausência de infecção no desafio, em camundongos imunizados com taquizoítos irradiados e desafiados com 03 diferentes cepas de *T.gondii*..... **62**

Tabela 2 - Correlação quantitativa preliminar entre eventos imunológicos e o grau de proteção obtido nos experimentos de desafio..... **64**

Tabela 3 - Correlação qualitativa preliminar entre eventos imunológicos e o grau de proteção obtido nos experimentos de desafio..... **65**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

($Al(OH)_3$) - hidróxido de alumínio.

^{60}Co – Cobalto 60.

AIDS – Acquired immunodeficiency syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

APC – Antigen Presenting Cells (Células Apresentadoras de Antígeno).

BSA – Bovine serum Albumin (Albumina bovina sérica)

DMSO – dimetilsulfóxido.

ELISA – Enzyme Linked immunosorbent Assay

ELISPOT – Enzyme Linked Immunosorbent Spot

GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue (Tecido Linfoide Associado ao trato Intestinal).

H-H – pontes de hidrogênio

GRAs – Dense granule Proteins (proteínas de grânulos densos)

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico.

HCV – Hepatitis C virus (Vírus da hepatite C)

HIV – Human immunodeficiency virus (Vírus da Imunodeficiência Humana).

IFNγ - Interferon - gama

IgA – Immunoglobulin A (Imunoglobulina A)

IgG – Immunoglobulin G (Imunoglobulina G)

IgM – Immunoglobulin M (Imunoglobulina M)

IL-10 - Interleukin 10 (Interleucina 10).

IL-12 – Interleukin 12 (Interleucina 12).

IL-2 – Interleukin 2 (Interleucina 2).

IL-4 - Interleukin 4 (Interleucina 4).

i.p. - immunization intraperitoneal (imunização intraperitoneal).

IL-5 - Interleukin 5 (Interleucina 5).

IVIAP - In vitro induced antibody production

MHC – Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MICs – Microneme Proteins (proteína de micronemas)

MMR – Measles, mumps and rubella (Sarampo, Caxumba e Rubéola).

MMRV - Measles, mumps, rubella and varicella (Sarampo, Caxumba, Rubéola e varicela).

MV – Measles virus (Vírus do Sarampo).

NaCl – Cloreto de sódio

OPD - *O*-Phenylenediamine

PBS – Phosphate buffered saline (Salina Tamponada com Fosfato)

PBST - Phosphate buffered saline Tween-20 (Salina Tamponada com Fosfato com Tween-20)

PBSTL - Phosphate buffered saline Tween-20 and skim Milk (Salina Tamponada com Fosfato com Tween-20 e leite desnatado)

PMSF – Phenylmethanesulfony Fluoride

RONs – Rhoptrys Neck Proteins (proteínas do colo das roptrias)

ROPs –Rhoptrys Proteins (proteínas de roptrias)

SAGs – Surface antigens (antígenos de superfície)

SIg – Secretory Immunoglobulin (Imunoglobulina secretora).

S-S – pontes de sulfeto

SIgA - Secretory Immunoglobulin A (Imunoglobulina A secretora).

TH1 – T helper cells type 1 (células T auxiliadora tipo 1)

TH2 - T helper cells type 2 (células T auxiliadora tipo 2)

TMB - Tetramethylbenzidine

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

V/V – (volume/volume).

V.O. – immunization per os (imunização or via oral).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... **20**

2 OBJETIVOS..... **23**

3 REVISÃO DA LITERATURA..... **24**

3.1 Resposta imune induzidas por vacinas..... **24**

3.1.1 Vacinas..... **25**

3.2 Resposta imunológica..... **27**

3.2.1 Resposta imune inata e adaptativa..... **27**

3.2.2 Resposta imune adaptativa celular e humoral..... **28**

3.2.3 Memória imunológica..... **30**

3.2.4 Imunidade de mucosas..... **31**

3.3 Radiação ionizante e produção de vacinas..... **32**

3.4 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose..... **34**

3.4.1 Ciclo de vida do Toxoplasma gondii..... **37**

3.4.2 Invasão celular e resposta imunológica para Toxoplasma gondii..... **39**

3.4.3 Vacinas para toxoplasmose..... **41**

3.4.4 Avaliação de vacinas na toxoplasmose – uma visão crítica..... **42**

4 MATERIAL E MÉTODOS..... **44**

4.1 Parasitas..... **44**

4.2 Animais Experimentais..... **44**

4.3 Obtenção de antígenos de *T. gondii*..... **45**

4.4 Irradiação..... **45**

4.5 Imunização dos animais..... **45**

4.6 Coleta do extrato fecal dos camundongos imunizados..... **46**

4.7 Detecção por ELISA de anticorpos específicos no soro e nas fezes dos camundongos imunizados..... **46**

4.8 Detecção da avidez de anticorpos específicos IgG sérico por ELISA..... **47**

***4.9 In vitro induced antibody production* (IVIAP) das células esplênicas e da medula óssea**..... **47**

4.10 Avidez em *In vitro induced antibody production* (IVIAP) das células esplênicas e da medula óssea..... **48**

4.11 Desafio dos camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados com taquizoítos de *T. gondii* com diferentes cepas cistogênicas do parasita..... **49**

4.12 Análise estatística..... **49**

5 RESULTADOS..... **50**

5. 1 Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados..... **50**

5.1.1 IgG total anti-T.gondii em soro..... **50**

5.1.2 IgG anti T. gondii de alta afinidade ou avidez..... **51**

5.1.3 Produção de IgA anti T. gondii no soro..... **52**

5.2 Resposta humoral secretora em fezes dos camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados..... **53**

5.3 Produção de anticorpos IgG anti *T. gondii* por células da medula óssea e por células esplênicas em camundongos BALB/c e C57Bl/6j imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados..... **55**

5.3.1 IgG anti T. gondii de alta afinidade ou avidez produzidos por células da medula óssea e por células esplênicas..... **57**

5.4 Proteção dos camundongos imunizados por via oral e por via

intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, após desafio com diferentes cepas cistogênicas..... **58**

5.4.1 Proteção quantitativa em camundongos BALB/c imunizados..... **58**

5.4.2 Proteção quantitativa em camundongos C57Bl/6j imunizados..... **60**

5.5 Proteção qualitativa contra desafio em camundongos após imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados..... **61**

5.6 Correlação entre eventos imunológicos e a proteção contra desafio em camundongos após imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados..... **62**

6 DISCUSSÃO..... **66**

7 CONCLUSÃO..... **77**

REFERÊNCIAS..... **78**

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose, um protozoário intracelular obrigatório de alta significância que infecta uma variedade de animais de sangue quente, como as aves e os mamíferos, incluindo o homem (Dubey et al., 1998). Aproximadamente 40% da população mundial apresentam anticorpos para *T. gondii*, mas geralmente, nos indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose é uma doença assintomática (Montoya e Liesenfeld, 2004). Quando sintomática, a toxoplasmose pode ser dividida em dois estágios: a fase aguda, onde há uma rápida proliferação de taquizoítos, e a fase crônica, onde os parasitas formarão os cistos teciduais e podem permanecer por toda a vida no hospedeiro (Dubey et al., 1998). A infecção crônica é similar em humanos e animais que desenvolvem uma proteção imune ao longo da vida contra uma reinfecção (Parker et al., 1991).

Em indivíduos imunodeprimidos, essa doença pode ser devastadora, como em pacientes portadores do vírus HIV (Antinori et al., 2004), transplantados em tratamento com imunosupressores (Derouin e Pelloux, 2008) ou ainda naqueles com neoplasias (Alvarado-Esquivel et al., 2010), sendo que a encefalite é a principal causa de óbito desses indivíduos. A transmissão congênita ocorre numa infecção primária materna durante a gestação, onde pode ocorrer a transmissão vertical dos parasitas via placenta para o feto, podendo causar aborto, hidrocefalia, corioretinite ou danos no sistema nervoso central (Petersen, 2007).

Na pecuária, a infecção por *T. gondii* tem uma importância econômica, devido à perda neonatal por infecção congênita, principalmente em carneiros e cabras (Dubey, 1990). Os animais de consumo infectados com o parasita desenvolvem cistos teciduais contaminando sua carne (Dubey e Jones, 2008). A ingestão de carnes cruas ou mal cozidas é considerada a principal fonte de transmissão da toxoplasmose para os humanos (Kijlstra e Jongert, 2008). Outra via de infecção importante é a ingestão de verduras, legumes, frutas ou água contaminada com oocistos de *T. gondii* (Dubey, 2006).

Muitos estudos têm avaliado vacinas para a toxoplasmose, utilizando cepas atenuadas (Gigley et al., 2009), proteínas recombinantes (Igarashi et al., 2008) ou subunidades de DNA de *T. gondii* (Liu et al., 2009), com vários graus de sucesso. Uma vacina (TOXOVAX®, Schering-Plough, Walton, Greater London, Inglaterra)

baseada em parasitas atenuados vivos é atualmente usada comercialmente para imunizar rebanhos de ovelhas lanígeras na Nova Zelândia (Buxton, 1993). Contudo, essas vacinas, que utilizam parasitas vivos atenuados, podem recuperar a virulência, gerando doença ou morte em animais jovens, portanto de uso pouco adequado fora dos animais de produção (Bhopale, 2003). Proteínas recombinantes têm sido recomendadas como candidatos a vacina, mas com resultados conflitantes (Dziadek et al., 2009).

A utilização da radiação ionizante, com intuito de produzir vacinas com parasitas irradiados, apresentou bons resultados tanto em helmintos (Wales e Kusel, 1992) como em protozoários (Hoffman e Doolan 2000). Em nosso grupo, taquizoítos de *T. gondii* irradiados na dose de 255Gy com Cobalto-60 não apresentam alterações biológicas, como a síntese de proteínas, metabolismo e invasão celular. A radiação ionizante, no entanto, induz dano no DNA do parasita, resultando no bloqueio da multiplicação no interior das células hospedeiras, num processo de morte mitótica (Hiramoto et al., 2002).

Para avaliar a eficiência de um modelo vacinal, podem ser realizados diversos ensaios imunológicos indiretos para a detecção da proteção desenvolvida, além dos ensaios clássicos de proteção após desafio. Estes ensaios devem refletir a imunidade produzida sem a necessidade de se desafiar o hospedeiro. A infecção pelo *T.gondii* gera uma imunidade específica, produzindo vários produtos mensuráveis, tanto da imunidade celular (Yamamoto et al., 2000) como da imunidade humoral (Carvalho, 2008).

Como a imunidade é importante para a proteção e ainda permanecem indefinida, as duas faces da resposta imune devem ser analisadas para se avaliar um modelo vacinal (Jongert et al., 2009). A maioria dos estudos avalia apenas um dos segmentos da imunidade. Na vacinação com a TOXOVAX® (Schering-Plough, Walton, Greater London, Inglaterra), foi analisada nos animais a presença de anticorpos IgG específicos por Western Blot (Wastling et al., 1994). Os estudos com produtos recombinantes geralmente avaliam a produção de anticorpos específicos (Dlugonska, 2008). Outra forma de avaliar uma resposta imune humoral é verificar a qualidade dos anticorpos específicos produzidos após a imunização. A maturação dos anticorpos ocorre durante uma resposta primária com produção de anticorpos de baixa afinidade e no decorrer dessa resposta imunológica torna-se de alta afinidade com o antígeno (Lappalainen e Hedman, 2004).

A memória imunológica é de grande importância para sucesso das vacinais atuais, sendo que células B de memória são localizadas estrategicamente em locais onde ocorre a drenagem de antígenos, como baço, epitélio de mucosas e medula óssea (Tangye e Tarlinton, 2009). A imunidade humoral após vacinação ou infecção é derivada principalmente por dois tipos celulares: plasmócitos, que mantém a produção basal de anticorpos, e células B de memória, que podem proliferar na presença de estimulo antigênico (Amanna e Slifka, 2010).

Os tecidos linfóides secundários, como baço, linfonodos, tecido linfóide associado a superfícies das mucosas, fornecem um ambiente importante para o desenvolvimento da resposta imune. Nesses locais ocorrem a migração e as interações entre células apresentadoras de antígeno, células T, células B e outras células acessórias. A cooperação entre essas células resulta em uma efetiva resposta imune humoral (Cariappa et al., 2005). A medula óssea, embora seja um órgão linfóide primário, pode servir como um órgão linfóide secundário, sendo de grande importância na indução da resposta imune humoral (Pillai e Cariappa, 2009), que depende da cooperação entre diversas células imunes (Tumanov et al., 2010). A circulação dessas células de memória específicas e a presença de anticorpos que neutralizam a infecção constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro para diversos patógenos (Manani-Matsuda et al., 2008).

Existem ensaios que permitem identificar a cooperação celular em um mesmo teste, envolvendo a proliferação de células a um determinado antígeno (memória imunológica) e a conseqüente produção de produtos específicos por estas células, como anticorpos ou linfocinas (Oliveira et al., 2003). A avaliação da quantidade ou da capacidade de produção destes produtos pode ser relacionada com ensaios de proteção, avaliando a relação de eventos e identificando produtos de maior relevância.

Nesse trabalho, comparamos a indução de memória imunológica na infecção natural e na imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados. Avaliamos as células produtoras de anticorpos totais e anticorpos de alta afinidade no baço e na medula óssea, comparando com a produção de anticorpos do soro. Estudamos, ainda, a produção de IgA nas fezes dos animais imunizados para ,finalmente, avaliar a proteção induzida pela imunização após o desafio com diferentes cepas do agente que apresentam perfis genéticos distintos.

2 OBJETIVOS

Gerais

Avaliar a memória imunológica em populações de células produtoras de anticorpos do baço e da medula óssea de camundongos imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados com uma dose de 255Gy e sua relação com a quantidade e avidez dos anticorpos séricos.

Específicos

Em camundongos infectados pela cepa ME-49 de *T.gondii* ou imunizados com taquizoítos irradiados da cepa RH, avaliamos:

- A produção e a afinidade de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro;
- A produção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* no soro;
- A produção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* nas fezes;
- As células produtoras de anticorpos IgG anti *T. gondii* em baço e medula óssea através da técnica de IVIAP;
- A afinidade dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* produzidos por células do baço e da medula óssea;
- Nível de proteção em animais imunizados e desafiados com diferentes cepas de *T. gondii*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resposta imune induzida por vacinas

As funções imunológicas têm sido estudadas atualmente para verificar a resposta especifica ao agente induzida por vacina (Plotkin, 2008). Essas funções podem ser divididas em vários tipos: resposta humoral, resposta por células B de memória, células T $CD4^+$ auxiliadoras ou células T $CD8^+$. A resposta humoral pode ser subdividida na secreção de anticorpos IgG, IgM ou IgA secretoras. Células T $CD4^+$ são necessárias para fornecer a ajuda para as células B e células T $CD8^+$ tem como função principal combater células infectadas (Plotkin, 2001). Anticorpos IgG e IgM em soro podem se difundir sobre a superfície da mucosa e agir sinergicamente com anticorpos IgA secretoras para prevenir a invasão e a infecção (Kaul e Ogra, 1998). Quase todas as vacinas atuais induzem anticorpos no soro ou na mucosa para bloquear a invasão do agente nas células hospedeiras (Robbins et al., 1995). Os anticorpos induzidos são funcionais diretamente contra o agente patogênico, ajudam o sistema imunológico com a opsonização por células ou neutralizam produtos e toxinas liberadas pelo agente (Pichichero, 2009). Isto demonstra a importância dos anticorpos na proteção induzida pela vacina, indiscutível para a proteção do individuo contra o agente.

A produção de células B de memória é um processo complexo que ocorre nos linfonodos, baço e medula óssea, envolvendo interações celulares complexas. Inicialmente a fagocitose do antígeno por células apresentadoras leva ao contato e reconhecimento de células T responsivas e consequente ativação para a produção de anticorpos e resposta imune efetora (Batista et al., 2001). Após a fase aguda, ocorre um processo de seleção das células produtoras de anticorpos, chamada de maturação da afinidade, onde são produzidos anticorpos de alta afinidade ao antígeno (Andersson et al., 1998). Isto é possível pela mutação aleatória dos genes da imunoglobulina e seleção de células B que expressam anticorpos na sua superfície com alta afinidade ao antígeno da vacina. Há também formação de células de memória especificas ao agente, o que pode rapidamente amplificar um novo desafio. Existe uma forte relação entre anticorpos funcionais e anticorpos de alta afinidade (Pichichero, 2009).

A resposta imunológica especifica é complexa e redundante, de modo que as vacinas podem proteger por induzir uma variedade de mecanismos efetores (Plotkin, 2008). A produção de anticorpos induzida por vacinação para hepatite B diminui com o tempo, de tal forma que em 10 anos após a vacinação, apenas cerca de um terço dos vacinados ainda apresentam níveis detectáveis de anticorpos (Lin et al., 2003). Após a introdução da vacinação, não houve evidência de novas infecções em vacinados, sendo esse sucesso atribuído às respostas de anticorpos de memória que ocorrem em tempo suficiente para se protegerem após a exposição (Lu et al., 2008).

A produção de anticorpos no soro induzidos pela vacinação é importante na proteção de algumas doenças, como difteria, tétano e poliomielite (Plotkin, 2001). Outras doenças, como rubéola, caxumba e sarampo, tem a importância da qualidade dos anticorpos induzidos pela imunização, que permite a avaliação da eficiência da imunização em uma única amostra pós vacinal (Panutti et al., 2004). Para a hepatite B, a detecção da presença de células de memória é importante para a definição da proteção para a doença (Plotkin, 2001).

Esta é uma breve demonstração da relevância das vacinas e dos seus métodos de detecção antes de um desafio. Sugerimos a leitura de algumas revisões para maior detalhamento (Pichichero, 2009; Tangye e Tarlinton, 2009; Plotkin, 2008; Roush e Murphy, 2007; Plotkin, 2001).

3.1.1 Vacinas

As vacinas estão entre as maiores conquistas da ciência biomédica e da saúde pública. Atualmente existe uma série delas contra diversas doenças infecciosas agudas e crônicas. Elas são responsáveis por estimular a resposta imune protetora no hospedeiro e as imunizações ocorrem principalmente nos primeiros meses de vida para a prevenção dessas doenças a longo prazo. As campanhas de vacinação são de grande importância, mostrando uma diminuição de mortes relacionadas às doenças infecciosas (Roush e Murphy, 2007).

Para a vacinação contra a poliomielite, existem duas vacinas diferentes, a vacina inativada, desenvolvida por Jonas Salk, e a vacina oral, desenvolvida por Albert Sabin, licenciadas, respectivamente, em 1955 e 1963 (Chumakov e Ehrenfeld, 2008). Ambas são efetivas no fornecimento de proteção individual contra a

poliomielite, mas a facilidade da administração oral e a redução de seus custos levou seu uso à maioria dos países (Chumakov et al., 2007). No entanto, a vacinação oral da poliomielite apresenta um problema, pois o vírus da poliomielite atenuado usado é geneticamente instável e em raras incidências pode estar associado à neurovirulência e poliomielite clínica (Minor, 2009).

A vacina combinada de sarampo, caxumba e rubéola (MMR), que utiliza vírus vivos atenuados, pode causar trombocitopenia (Mantadakis et al., 2010) e orquite (Clifford et al., 2010) após a vacinação. Vacinas para a prevenção do sarampo, caxumba e rubéola estão disponíveis desde década de 1960 e, na década seguinte, foi desenvolvida outra para previnir a varicela (Vesikari et al., 2007). A vacina de rotina, utilizando um esquema de duas doses da vacina contra MMR, é hoje fundamental para o controle dessas três doenças. A vacinação da varicela de rotina foi implementada de forma mais limitada, no entanto, nos EUA, esta foi licenciada em 1995 e recomendada para a administração universal de crianças maiores ou de 12 meses de idade (Davis et al., 2004). Para controlar as quatro doenças, através de uma vacina combinada com virus atenuados de sarampo, caxumba, rubéola e varicela (MMRV), mostram que duas doses da vacina MMRV foram consideradas uma opção melhor do que a administração separada da vacina da tríplice viral (MMR) e a vacina contra varicela (Davis et al., 2004). Uma das vantagens da vacinação MMRV é proporcionar a facilitação da execução da rotina de vacinação contra a varicela, além de vacinas combinadas geralmente apresentarem uma adesão maior do que a administração de várias vacinas monovalentes (Czajka et al., 2009).

Doenças como poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola apresentam imunidade permanente após a infecção natural (Pichichero, 2009) e os programas de vacinação nos Estados Unidos com vacinas atenuadas levaram a uma redução de mais 95% na incidência dessas doenças (Roush e Murphy, 2007).

Na vacinação contra hepatite B são utilizadas vacinas recombinates. A revisão realizada por Stübgen (2010) mostra a ocorrência e importância de várias doenças imunomediadas associadas com a administração na vacina recombinante da hepatite B. Neste trabalho, relata estudos epidemiológicos, relatos de casos com miopatia, neuropatia ou doenças neuromuscular após a vacinação. Atualmente não é possível identificar os indivíduos mais propensos a desenvolver essas complicações imprevistas após a imunização, indicando que os beneficios globais da

administração da vacina superam seus riscos, especialmente em adultos com estilos de vida ou ocupações que aumente o risco de exposição ou infecção pelo vírus da hepatite B (Stübgen, 2010).

A vacinação contra febre amarela foi implantada no final da II Gerra Mundial (Frierson, 2010). Ela é composta por vírus vivo atenuado (17D) e induz a uma ampla e potente resposta de células T contra várias proteínas virais (Mudd et al., 2010). Existem relatos iniciais, na Nigéria, em 1953, apontando que após a introdução da vacina com reações neurológicas os casos de encefalite foram associados com a vacinação da febre amarela (Macnamara, 1953).

Doenças como difteria e tétano são causadas pela toxina produzida pela bactéria, não propriamente pelo agente. Dessa maneira, o desenvolvimento de vacinas para esse tipo de doença precisa induzir uma resposta especifica à toxina liberada pelo agente (Parkins et al., 2009). Vacina para difteria, baseada em toxina diftérica tratada com formalina, está disponível desde 1926 e a partir de sua introdução na América do Norte houve uma diminuição de 99% de mortes relacionadas à doença (Roush e Murphy, 2007). Vacinas contra o tétano estão inalteradas na formulação praticamente desde 1940. Esta é composta por toxina tetânica inativada com formalina e associada com sais de alumínio. Desde sua introdução nos Estados Unidos, a incidência de tétano diminuiu 93% (Roush e Murphy, 2007).

3.2 Resposta imunológica

3.2.1 Resposta imune inata e adaptativa

As células do sistema imune inato são essenciais no inicio da resposta (Lee e Ratajczak, 2009), sendo inicialmente composta pelas células epiteliais, a primeira linha de defesa do hospedeiro contra uma infecção oral (Buzoni-Gatel e Werts, 2006). A ligação celular complexa entre enterócitos, presença de muco e o próprio movimento peristáltico, estabelecem barreiras físicas contra a penetração de microorganismos intestinais (Woof e Mestecky, 2005). Esta ligação entre as células é formada pelas junções celulares, com as proteínas claudinas e ocludinas, que se associam às membranas plasmáticas de células vizinhas, formando uma zônula

oclusiva e tornando o meio interno impermeável, evitando, assim, a entrada de microorganismos (Kasper et al., 2004).

A produção de IL-12 contribui para a ativação do tecido linfóide associado ao trato intestinal (GALT), além disso, essa citocina participa no desenvolvimento da resposta inflamatória e está relacionada com a ativação das vias apoptóticas (Gavrilescu e Denkers, 2003). Várias populações de células inatas têm sido implicadas como fonte de IL-12, com evidências experimentais de sua produção por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas e papel proeminente para esses eventos (Liu et al., 2006). Esta citocina é secretada durante a estimulação antigênica, sendo encontrada em maiores níveis durante a fase aguda da infecção (Filisetti e Candolfi, 2004). Os neutrófilos são as primeiras células-resposta que liberam citocinas pró-inflamatórias e várias quimiocinas em resposta da infecção causada por *T. gondii* (Buzoni-Gatel et al, 2006).

Os macrófagos também apresentam uma grande importância para a imunidade inata, pois essas células também podem ser um componente importante na ponte de ligação entre a imunidade inata e adquirida, sendo capazes de produzir grandes quantidades de IL-12 e apresentar peptídeos antigênicos em associação com complexo do MHC (Hsieh et al.,1993).

A resposta imune inata fornece mecanismos essenciais para rápida detecção e eliminação do patógeno (Stevenson e Riley, 2004). A imunidade adaptativa tem evoluído para oferecer uma resposta mais ampla de reconhecimento antigênico (Pancer e Cooper, 2006). A imunidade adaptativa envolve uma interação entre células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e B (Cooper e Alder, 2006). Além da especificidade da resposta à imunidade adaptativa, apresenta outra característica, a geração da memória imunológica, ou seja, após o primeiro contato com o antígeno, os conjuntos de células T e B são ativados e, consequentemente, ocorre a formação de células de memória, onde permanecerão por longo tempo. Se houver um segundo contato com o mesmo patógeno, as células de memória são ativadas rapidamente, ocorrendo uma resposta mais rápida contra o agente (Bonilla e Oettgen, 2010).

3.2.2 Resposta imune adaptativa celular e humoral

Células do sistema imune adaptativo incluem células efetoras, da resposta imune celular, como ativação de linfócitos T e a resposta imune humoral com células produtoras de anticorpos, os linfócitos B (Yap e Sher, 1999). Os linfócitos são altamente móveis e após seu desenvolvimento nos órgãos linfóides primários, timo para maturação de linfócitos T (Hedrick, 2008) e a medula óssea para maturação de linfócitos B (LeBien e Tedder, 2008), migram para órgãos linfóides secundários, incluindo linfonodos e baço, onde ocorre a resposta imune adaptativa (Bonilla e Oettgen, 2010). Essa resposta muitas vezes é influenciada pelo sistema imune inato, através da ativação de células apresentadoras de antígenos (APC), considerando que esses linfócitos podem percorrer vários locais do corpo para exercer funções efetoras (McHeyzer-Williams, 2003).

A resposta imune celular e humoral é encadeada por gerar uma resposta efetora adequada para qualquer estímulo externo. Essa resposta ao agente invasor tem como principal função eliminá-los, poupando o hospedeiro de danos colaterais excessivos (Good-Jacobson e Shlomchik, 2010).

Durante a resposta imunológica adaptativa, as citocinas, proteínas que medeiam as reações imunológicas e inflamatórias, são produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imunológico. As citocinas induzem proliferação ou ativação celular (Abbas et al., 2007), a produção de IFNγ por células "*natural killer*", linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (Filisetti e Candolfi, 2004), apresentam numerosas atividades biológicas, incluindo a ativação de macrófagos, indução do complexo MHC de classe II e inibição da resposta TH2 (Gazzinelli et al., 1991). Outra citocina inflamatória é o TNF-α, produzida por macrófagos, monócitos, linfócitos T e mastócitos, exercendo efeito de proteção inicial quando há um aumento de macrófagos infectados com patógenos. A IL-10 é secretada por linfócitos T $CD4^+$ do tipo TH2, macrófagos e linfócitos B, e inibe a proliferação de linfócitos T $CD4^+$ do tipo TH1. Sua secreção também inibe a produção de nitratos e radicais oxigenados, induzidos por citocinas pró-inflamatórias de macrófagos (Filisetti e Candolfi, 2004). A IL-4 também é secretada por linfócitos T $CD4^+$ do tipo TH2, basófilos, mastócitos e determinadas populações de linfócitos T $CD8^+$ (Sansoni et al., 2008). A resposta imune humoral é mediada por produção de anticorpos por linfócitos B, à medida que é o principal mecanismo de defesa contra microrganismos extracelular e toxinas (Goins et al., 2010).

Para uma resposta humoral especifica ao agente, o processo se inicia pela indução de células produtoras de anticorpos, os plasmócitos, que tem o período de vida curto, porém com uma explosão inicial de anticorpos menos específicos, provavelmente desempenhando um papel inicial importante na proteção. Simultaneamente, outro lado da resposta é freqüentemente desencadeado, a função efetora tardia, mas com uma proteção em longo prazo, gerando células de memória (Good-Jacobson e Shlomchik, 2010). O aumento da eficácia da resposta humoral ocorre devido à produção de níveis amplificados de anticorpos antígenos específicos. Isso se deve provavelmente à ativação seletiva de células de longa duração, as células B, antígenos específicos de memória (Goins et al., 2010).

3.2.3 Memória imunológica

Memória imunológica é uma marca do sistema imunológico dos vertebrados. As células B de memória estão associadas à resposta especifica ao agente, resultando em produção de imunoglobulinas, IgG e suas subclasses, IgM e IgA (Rajewsky, 1996). A primeira exposição antigênica leva a uma resposta imune lenta e modesta, enquanto que a exposição repetida, mesmo muitos anos depois, leva a uma resposta rápida e exagerada, duas a três vezes maiores do que a exposição primária (Goins et al., 2010).

A afinidade e maturação da resposta imunológica ocorrem após uma extensa proliferação e seleção clonal de células B. Essa maturação é desencadeada pela ativação das sinapses imunológicas, ou seja, cooperação entre duas células da resposta imune. Na primeira sinapse (I), ocorre a interação entre as células apresentadoras, contendo antígenos (APCs) com as células T, através do receptor de células T. Esse reconhecimento do MHC-II e antígeno pelas células T auxiliadoras é a fase central do desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Na sinapse II, ocorre a interação das células T com as células B ou células CD8, direcionando uma resposta especifica ao antígeno com proteínas e células específicas ao antígeno. Na sinapse III, que é uma fase de grande importância, ocorre a seleção dos clones de maior especificidade no centro germinativo, que leva ao desenvolvimento de células B de memória, ativando o centro germinativo, proporcionando uma rápida expansão dessas células, assim como sua maturação e afinidade com os anticorpos (McHeyzer-Williams e McHeyzer-Williams, 2005).

A maturação dos anticorpos ocorre durante uma resposta primária com produção de anticorpos de baixa afinidade e, no decorrer dessa resposta imunológica, estes são substituídos progressivamente por anticorpos de alta afinidade com o antígeno (Lappalainen e Hedman 2004). Estudos com a proporção de anticorpos específicos de alta afinidade, ou avidez de anticorpos, têm sido avaliados no diagnostico de doenças. Na toxoplasmose e em outras doenças, essa técnica permite a diferenciação entre uma infecção primária ou secundaria, sendo muito utilizada em mulheres grávidas com suspeita de toxoplasmose (Elyasi et al., 2010).

A maioria dos estudos sobre memória imunológica é abordado em imunização sistêmica, sendo poucos os dados disponíveis sobre os mecanismos da "memória" em imunizações nas mucosas. No entanto, são de especial importância a indução e manutenção da memória imunológica em superfícies mucosas, pois é a entrada da maioria dos patógenos (Gallichan e Rosenthal 1996). A memória imunológica em superfícies mucosas apresenta uma maior complexidade, pois a indução da imunidade e sua seleção são feitas através de proteínas solúveis com ausência de adjuvante (McGhee et al., 1999).

3.2.4 Imunidade de mucosas

As superfícies de mucosa dos mamíferos são fisiologicamente ativas e interagem com uma diversidade de microrganismos patogênicos e não patogênicos, incluindo diversos antígenos presentes no ambiente. A principal resposta adaptativa a este desafio tem sido a evolução das barreiras físicas, químicas, humorais e celulares que protegem as superfícies da mucosa, sem comprometer a sua fisiologia (Strugnell e Wijburg, 2010).

O sistema imune das mucosas consiste em agregados de linfócitos, macrófagos e outras células acessórias localizadas abaixo do epitélio mucoso, como linfócitos intraepiteliais difusamente espalhados, as placas de Peyer e o tecido linfóide, associado à mucosa na lâmina própria do intestino delgado (Wijburg et al., 2006). O epitélio intestinal ao redor das placas de Peyer é especializado de modo a permitir o transporte de antígenos para o tecido linfóide, função realizada por células epiteliais, denominadas células M (microfold cells). Essas células M são capazes de

absorver, transportar e possivelmente processar e apresentar os antígenos às células linfóides sub-epiteliais (Debard et al., 2001).

Uma das adaptações desse sistema imune de mucosa é o transporte ativo de imunoglobulina secretora (SIg) para o espaço luminal. Essas imunoglobulinas são transportadas para a superfície da mucosa por um receptor celular conhecido como o receptor de imunoglobulina polimérica, que interage com os anticorpos responsáveis pelo transporte da cadeia J (cadeia 'joining'), especialmente IgM pentamérica ou IgA dimérica (Johansen et al., 2000). Essa imunoglobulina secretora (SIgA) é a primeira linha de reconhecimento antigênico e de defesa contra os patógenos intestinais, tendo também células efetoras CD8 e neutrófilos como auxiliares. Apesar disso, a necessidade de permeabilidade da superfície das mucosas cria uma vulnerabilidade às doenças, que resulta na complexibilidade e extensão do tecido linfóide associado ao trato intestinal (Buzoni- Gatel et al., 2006).

3.3 Radiação ionizante e produção de vacinas

A radiação gama, os raios X e os raios ultravioletas têm sido úteis para a atenuação de agentes de diversas espécies de parasitas. Em muitos casos, os parasitas irradiados induzem um alto nível de imunização e estudos demonstraram que a radiação será ideal se promover a incapacidade do parasita de reproduzir-se no hospedeiro, mantendo a viabilidade e a ação imunogênica adequada (Wales e Kusel, 1992). A utilização da radiação ionizante como uma ferramenta capaz de criar imunógenos é descrita desde os anos 50 (Taylor et al., 1986).

Em *T. gondii*, a radiação ionizante foi empregada inicialmente por Dubey e colaboradores (1986) com o objetivo de eliminar a infectividade de cistos em carnes contaminadas ou oocistos presentes em alimentos contaminados (Dubey et al., 1998).

A radiação ionizante consiste em ondas eletromagnéticas que se formam a partir de transições nucleares, apresenta alta energia, ausência de massa e a capacidade de promover ionização e excitação nos meios, possuindo um alto poder de penetração (Grosh e Hoopywood, 1979). Os feitos dessa radiação podem ser diretos, em conseqüência da interação imediata da energia com o alvo molecular, ou indiretos, pela interação secundária de espécies reativas produzidas pela radiação em outras moléculas do meio, principalmente pelo efeito conhecido como radiólise

da água, formando hidrogênio molecular (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e vários radicais livres, como hidroxila ($OH^{\bullet}$), elétron aquoso (e^{-}_{aq}), átomo de hidrogênio ($H^{\bullet}$) e peroxila ($HO_2^{\bullet}$) (Wallace, 1998).

As lesões da radiação nas células é em grande escala causada pelo estresse oxidativo, sendo que espécies reativas de oxigênio e radicais livres reagem com a macromolécula celular, como, por exemplo, ácidos nucléicos, lipídios e proteínas, provocando alterações nessas moléculas e ampliando os efeitos da radiação (Wales e Kusel, 1992).

Nos ácidos nucléicos podem ocorrer alterações, como formação de dímeros e rupturas de cadeias únicas de DNA, capazes de serem reparados pelos sistemas enzimáticos associados ao reparo desta molécula (Upton, 2001). Além disso, a radiação pode promover quebras na fita dupla do DNA, impedindo a sua re-associação adequada e o conseqüente reparo do erro. Nesse caso, ocorre um efeito clastogênico, no qual são separadas grandes partes do genoma das regiões centroméricas, responsáveis por orientar a divisão celular, levando a efeitos mínimos na sobrevida do individuo irradiado e impedindo sua divisão celular adequada. Essa ocorrência gera a morte de suas células-filhas por meio da perda de material genético desassociado aos centrômeros somente no momento da divisão celular, denominada de morte mitótica (Leonard et al., 2005).

Os lipídios também são atingidos pela radiação ionizante, principalmente pelos radicais livres, que interagem com as membranas biológicas fazendo uma desagregação com os lipídios, alterando a estrutura das membranas e tornando-a mais rígida, conseqüentemente resultando em morte celular por apoptose (Lizard et al., 1995). O efeito da radiação pode estar relacionado ao início da peroxidação de lipídios por esses radicais, onde o processo ocorre principalmente dentro da membrana celular, que apresenta alta concentração de ácido graxo poli-insaturados, como as membranas microssomais e mitocôndrias, sendo assim mais suscetíveis à peroxidação lipídica, tendo como conseqüência a perda de sua integridade e a diminuição no funcionamento celular (Manzi et al., 2003).

As alterações em proteínas são oriundas principalmente da interação dos produtos da radiólise da água com aminoácidos das cadeias protéicas, promovendo uma desaminação (Butler et al., 1987). A destruição dos aminoácidos e o rompimento de cadeias peptídicas, com alterações de ligações intramoleculares (H–H e S–S) e reorganização da molécula protéica por agregação, são algumas das

alterações estruturais que podem ocorrer, levando à modificação das propriedades biológicas das proteínas (Adams et al., 1972).

Os efeitos da radiação nas células relacionadas com essas alterações induzidas pela ação direta ou indireta da radiação são sugestivos para uma melhor resposta imunológica (Pinho et al., 1995), devido à oxidação das proteínas, levando a uma fagocitose preferencial por células imunes através de receptores *scavengers* (Cardi et al., 1998), sendo uma importante ferramenta para a produção de imunógenos.

Taquizoítos de *T. gondii,* irradiados na dose de 255 Gy com Cobalto-60, mantêm todas as características biológicas, como síntese protéica e invasão celular, perdendo apenas o poder de multiplicação dos parasitas no interior das células através do processo de morte mitótica (Hiramoto et al., 2002).

3.4 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* foi descoberto independentemente por Splendore (1908) em coelhos, no Brasil, e pouco depois por Nicolle e Manceaux (1908) em roedores do norte da África. É um parasita intracelular obrigatório que pertencente ao filo Apicomplexa, afetando animais homeotermos, como as aves e os mamíferos, causando a toxoplasmose. Os protozoários desse filo caracterizam-se por possuirem uma estrutura chamada complexo apical, responsável pela invasão celular, onde apresentam diversas organelas características do filo: anéis polares, conóide, róptrias, micronemas, além das estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Dubey et al., 1998). (figura 1).

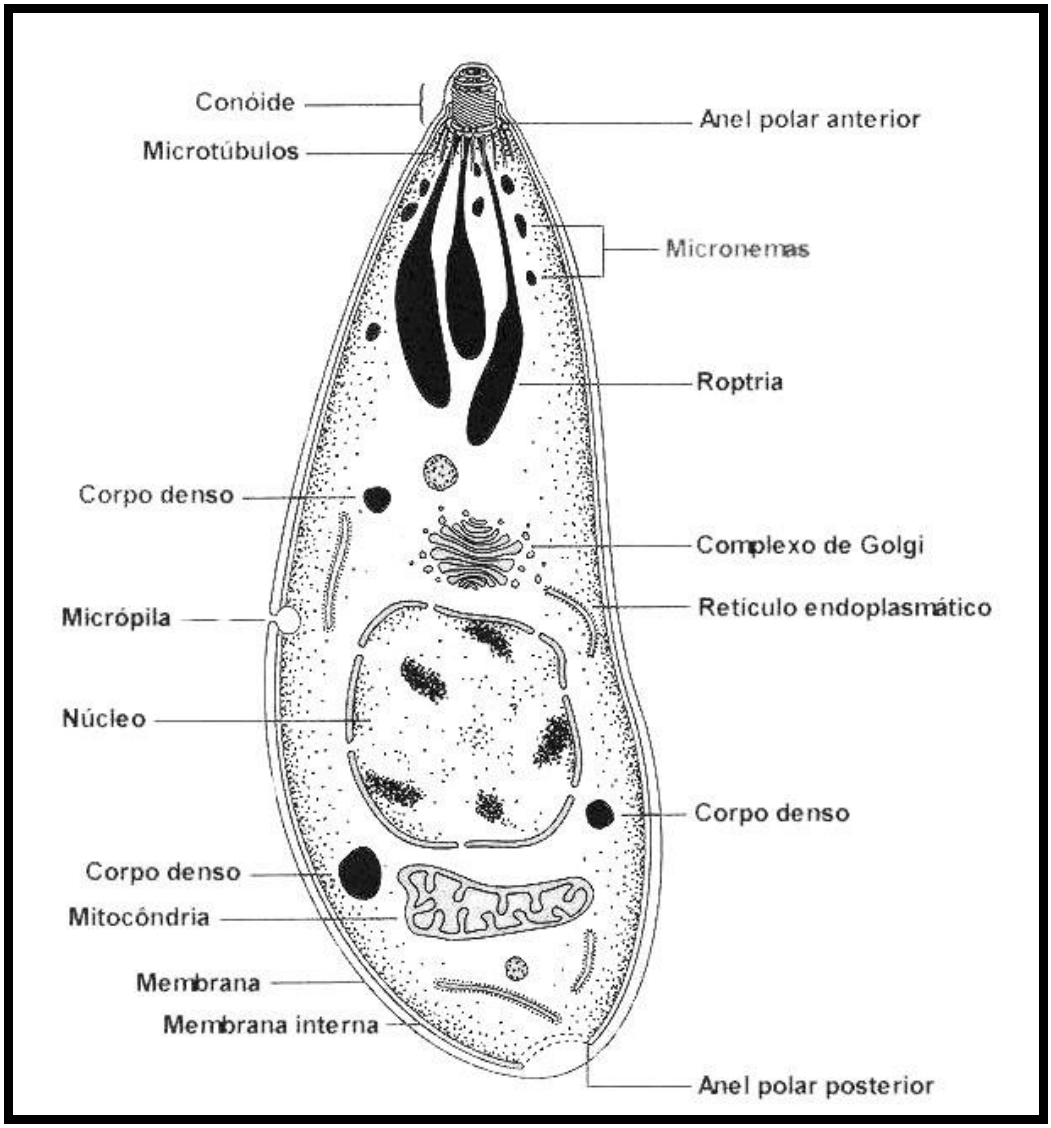

Figura 1 - Morfologia esquemática de *T. gondii.* Fonte: Acervo do Laboratório de Protozoologia do IMTSP.

A toxoplasmose atinge cerca de meio bilhão de pessoas do mundo todo, sendo sua maior incidência nas áreas tropicais (Cong et al., 2005). O soro prevalência na Europa é alto, com 54% nos países do sul Europeu e cerca de 10% nos países do norte (Welton e Ades, 2005). Um estudo realizado nos EUA, em 1999 e 2000, relatou que 15,8% das pessoas apresentavam soro positivo para *T. gondii* (McQuillan et al., 2004). Na America do Sul, a infecção causada por *T. gondii* é comum, sendo que no Brasil foi encontrado soro prevalência alta em regiões que apresentavam condições sócio-econômica inferiores, onde a principal via de transmissão e por água contaminada (Bahia-Oliveira et al., 2003).

A toxoplasmose é uma doença que não apresenta sintomas específicos e raramente provoca doença grave no seu hospedeiro, com conseqüência de

formação de cistos que pode permanecer na forma latente por toda a vida do hospedeiro em muitos órgãos, principalmente no sistema nervoso central, músculo estriado esquelético, liso e cardíaco (Mozzatto e Procianoy, 2003). A infecção por *T. gondii* pode atingir a região ocular, sendo que a toxoplasmose ocular é a causa mais comum de identificação de uveíte, o que pode levar à perda de visão (Escoffier et al., 2010). Devido à sua alta prevalência, resulta em número significativo de pacientes afetados. É uma doença de grande importância médica e veterinária, pois causa a infecção congênita e abortos, tanto em humanos como em animais (Zou et al., 2009).

A incidência de toxoplasmose congênita humana é de 1-6/1000 nascimento. Embora muitos recém-nascidos não apresentassem sintomas após o nascimento, algumas seqüelas podem se desenvolver durante a vida do paciente (Remington e Desmonts, 1973). Se mulheres grávidas adquirir uma infecção primária por *T. gondii* durante a primeira (25%), segunda (54%) ou terceira (65%) semana de gestação, podem transmitir o parasita por contato do sangue via placenta para o feto, causando lesões inflamatórias que acarretam danos neurológicos permanentes, com ou sem hidrocefalia e microcefalia, ou corioretinite, que podem ocasionar a diminuição da visão (Petersen, 2007).

Em indivíduos com o sistema imune deficiente, a encefalite é a mais frequente, caracterizada pela rápida proliferação do parasita. Devido à ineficiência do sistema imunológico do paciente, ocorre a destruição dos tecidos neurais, podendo levar o indivíduo à morte (Luft e Remington, 1992).

Em pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), foram relatados casos de toxoplasmose (Luft e Remington, 1992). Na década de 80, a prevalência de encefalite causada pelo parasita foi similar à prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em cerca de 10% dos pacientes com AIDS nos Estados Unidos. Na Europa, o índice foi de quase 50% (Luft et al., 1993) e na Itália a prevalência de 26% em pacientes com AIDS (Antinori et al., 2004).

Em pacientes transplantados, a toxoplasmose pode resultar a partir de um órgão transplantado de um doador soropositivo para *T. gondii* para um receptor soronegativo, e também de uma reativação da doença, devido à ineficiência do sistema imune do transplantado. Foi relatada a presença de encefalite causada por *T. gondii* em pacientes que sofreram transplante de fígado, coração e medula óssea,

entretanto, nos casos de transfusão sanguínea a transmissão do parasita é extremamente rara (Derouin e Pelloux, 2008).

Pacientes que apresentam doenças neoplásicas, tanto hematológicas como tumores sólidos, também podem adquirir a toxoplasmose e estão sujeitos a uma reativação da doença, devido ao tratamento que diminui o funcionamento do sistema imunológico (Israelski e Remington, 1993).

A principal via de contaminação da toxoplasmose, tanto para humanos como para animais, está relacionada, na maioria das vezes, com o consumo de alimentos contaminados, como carnes contendo cistos de *T. gondii*, verduras, legumes ou água contaminada com oocistos de *T. gondii* (Forbes et al., 2009). Um estudo sobre fontes de contaminação para toxoplasmose mostrou que uma estimativa de 30-60% das gestantes com toxoplasmose aguda apresentou consumo de carne mal passada como fonte de contaminação dessa infecção (Cook et al., 2000). No entanto, o fato de que os vegetarianos também são infectados com *T. gondii* demonstra que contaminação de oocistos ainda desempenha um papel importante na infecção (Roghmann et al., 1999).

Infecções experimentais de animais destinados à alimentação, tais como bovinos, suínos, ovinos e caprinos, mostraram que esses animais são suscetíveis à contaminação pelo *T. gondii* por infecção de oocistos ou cistos de tecido (Dubey e Thulliez, 1993). Além da contaminação da carne, a toxoplasmose pode causar abortos nesses animais, ocasionando perdas econômicas consideráveis para a indústria agrícola (Dubey et al., 2005).

3.4.1 Ciclo de vida do Toxoplasma gondii

O agente apresenta um ciclo complexo, sendo os felinos os hospedeiros definitivos, com reprodução sexuada nas células epiteliais do intestino delgado. A formação de oocistos resulta dessa reprodução e tem como hospedeiros intermediários animais de sangue quente, incluindo o homem, que apresentam a forma assexuada do parasita e cistos teciduais (Dubey et al., 1998).

A ingestão do parasita, tanto nos felinos como nos hospedeiros intermediários, pode ocorrer na forma de esporozoítos, dentro de cistos teciduais e de oocistos, taquizoítos ou bradizoítos. Após a ingestão de cistos teciduais ou de oocistos, ocorre a degradação da parede cística no estômago e intestino delgado

por enzimas proteolíticas, liberando os bradizoítos ou esporozoítos que penetram nas células epiteliais do intestino delgado, iniciando a multiplicação do parasita por endodiogenia, que originarão os taquizoítos, ocorrendo a sua rápida proliferação e disseminando-o por todo o corpo do hospedeiro (Dubey et al., 1998).

Nas células epiteliais do intestino delgado dos felinos, encontram-se cinco estágios diferentes do *T. gondii* antes de iniciar a gametogênese. A formação de gametas se inicia logo após o ciclo assexuado por diferenciação em macrogametócito (gameta feminino), que permanece na célula epitelial, e microgametócitos (gameta masculino), produzindo de 10 a 21 microgametas biflagelados. Estes saem para o meio externo, indo fertilizar o macrogametócito. A fecundação dará origem aos oócitos, responsáveis pelo desenvolvimento de uma membrana cística, formando os oocistos imaturos que são liberados no meio ambiente através das fezes desses animais. No meio externo, os oocistos sofrem a esporulação, resultando na formação de dois esporocistos e quatro esporozoítos cada. Os oocistos esporulados são resistentes e podem sobreviver de meses a um ano em condições ambientais usuais (Dubey et al., 1998). Outras formas mais raras de contaminação da toxoplasmose podem ser adquiridas pela transfusão sanguínea, doação de órgãos ou ainda pelos acidentes laboratoriais (figura 2).

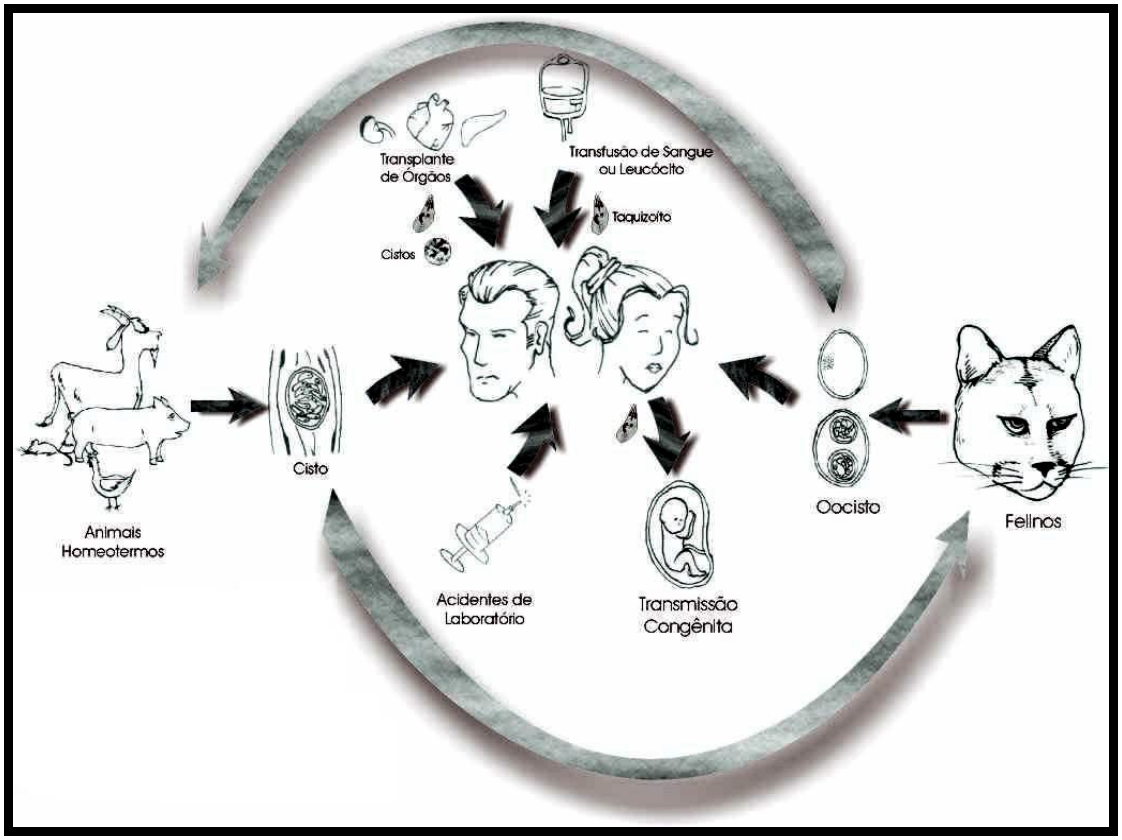

Figura 2 - Ciclo de vida do *T. gondii,* com suas formas de infecção para o homem.
Fonte: Acervo do laboratório de Protozoologia do IMTSP

3.4.2 Invasão celular e resposta imunológica para Toxoplasma gondii

Os mecanismos de invasão do parasita na célula hospedeira é cálcio dependente e extremamente rápido, de 15 a 40 segundos (Caldas et al., 2007). Esses mecanismos são regulados por vários fatores, tais como movimento do conóide e a seqüência de secreção de proteínas das organelas do complexo apical, como micronemas, róptrias e grânulos densos (Hoff e Carruther, 2002). O processo de invasão celular é complexo e de grande importância para sobrevida do parasita no hospedeiro (Caldas et al., 2009). O vacúolo parasitóforo é formado após a penetração do parasita, onde ocorre uma associação com a membrana plasmática da célula hospedeira e torna-se irreconhecível para os sistemas citoplásticos de membranas, não ocorrendo a fusão de lisossomos. Dentro do vacúolo, o parasita faz a captação de nutrientes, energia e ainda ocorre a reprodução (Mordue et al., 1999).

A infecção por *T. gondii* ocorre principalmente por via oral nos hospedeiros, sendo assim a mucosa intestinal o primeiro contato com o parasita (Buzoni-Gatel et al., 2006), que consegue cruzar o epitélio intestinal. Devido à sua mobilidade e

virulência, durante a sua migração a integridade da barreira celular não é alterada (Barragan e Sibley, 2002). O *T. gondii* utiliza mais de um ligante para penetrar em diferentes células hospedeiras, sendo que a proteína SAG 1, entre os outras, estão associadas ao processo de adesão desse parasita (Buzoni-Gatel et al., 2006). A infecção por *T. gondii* em enterócitos pode dar início a uma série de eventos do sistema imunológico inato, conduzindo a um processo inflamatório no tubo digestivo. Estes primeiros eventos estabelecem condições de longo prazo da imunidade protetora contra a re-infecção e talvez uma reativação da doença (Kasper et al., 2004).

O *T. gondii* é um excelente imunógeno, produzindo uma resposta organizada que resulta na produção de uma resposta imune inata e adaptativa (Dunay e Sibley, 2010). A infecção intracelular do parasita nos macrófagos estimula a produção de IL-12 e TNF-α (Gazzineli et al., 1996). A IL-12 é responsável pela ativação de células *"natural killer"* e células T para estimular a produção de IFN-γ, que são cruciais para a resistência. O TNF-α é essencial na inibição da replicação do parasita, mas esta ação somente pode ser exercida em sincronia com a produção de IFN-γ (Langermans et al., 1992). A infecção por *T. gondii* induz a uma forte e duradoura proteção imunológica para o hospedeiro (Denkers e Gazzinelli, 1998). A imunidade protetora é caracterizada por uma forte resposta TH1 centrada na produção de IFN-γ (Gazzineli et al., 1991). Essa resposta imune limita a expansão do parasita e induz a sobrevida do hospedeiro, mas, em contradição, estimula a conversão do parasita para bradizoítos, formando os cistos teciduais, principalmente no tecido muscular e sistema nervoso central (Filisetti e Candolfi, 2004). Essa forma do parasita é resistente à resposta imune e pode sobreviver por longo tempo, ou até mesmo por toda a vida do hospedeiro (Cong et al., 2005).

Entre a população de células T, as células T $CD8^+$ são consideradas as principais células efetoras responsáveis pela proteção contra *T. gondii. A*s células T $CD4^+$ desempenham um papel sinérgico e, além disso, a baixa produção de células T, tanto CD8 como CD4, diminui a proteção imunológica em animais imunizados e desafiados com cepa TS-4 de *T. gondii* (Gazzineli et al., 1991). As células T $CD4^+$ do tipo Th1 exercem seu efeito protetor por meio da produção de IFN-γ e IL-2. Por outro lado, as citocinas produzidas pelas células T $CD4^+$ do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-

10, estão associadas à baixa regulação da proteção mediada por células, portanto estas citocinas ajudam as células B na produção de anticorpos (Bhopale, 2003).

A produção de IFN-γ é encontrada em humanos durante a fase aguda da toxoplasmose e em bebês recém-nascidos infectados durante a gravidez (Raymond et al., 1990). Em camundongos, a secreção de IFN-γ aumenta a atividade de fagocitose em macrófagos e a atividade citotóxica de linfócitos T $CD8^+$ (Ely et al., 1999). TNF-α é responsável pela indução de proteínas inflamatórias durante a fase aguda da infecção e na toxoplasmose (Langermans et al., 1992). Em modelos experimentais com toxoplasmose, a IL-10 induz a imunossupressão na proliferação de células esplênicas (Candolfi et al., 1995). A IL-4 sozinha não influencia o crescimento intracelular do *T. gondii in vitro* (Appelberg et al., 1992), entretanto, *in vivo,* a IL-4 em camundongo é importante na resistência durante a infecção por *T. gondii* (Villard et al., 1995).

3.4.3 Vacinas para toxoplasmose

Atualmente a única vacina comercial para toxoplasmose é utilizada na Nova Zelândia para imunização de ovinos, realizadas com taquizoítos vivos de uma cepa S48 “incompleta” (Buxton, 1993). Outro modelo de vacinação para toxoplasmose utilizando taquizoítos vivos de *T. gondii* da cepa TS-4 em suínos mostraram uma proteção quando esses animais são desafiados com oocistos por via oral (Pinckney et al., 1994). Estudos mais recentes mostraram que ovinos vacinados com cepa RH mutante de *T. gondii* reduziram o número de abortos (Mevelec et al., 2010). Esses modelos vacinais, utilizando cepas atenuadas, não apresentam uma eficiência adequada, podendo recuperar a sua virulência, principalmente em animais jovens, e ainda pode promover a infecção com formação de cistos teciduais e, consequentemente, uma carne imprópria para o consumo humano (Alexander et al., 1996).

A maioria dos estudos atuais sobre as vacinas para toxoplasmose foca nas proteínas recombinantes de fácil obtenção com o avanço da biologia molecular, como as proteínas de superfície (SAGs), consideradas o principal antígeno para o hospedeiro (Letscher-Bru et al., 2003). Estas imunizações provocam diferentes tipos de proteção de acordo com a linhagem isogênica do camundongo desafiado. Vacinas com DNA, codificando esta proteína, protegem camundongos BALB/c

adultos contra a toxoplasmose adquirida, mas não protege da infecção congênita (Couper et al., 2003). Além das proteínas de superfície, aquelas que estão presentes no processo da invasão celular são consideradas importantes imunógenos vacinais, como ROPs, RONs, MICs e GRAs, localizadas respectivamente nas organelas características do parasita que são as Roptrias, Micronemas e Grânulos Densos (Dlugonska, 2008).

Uma vacina para prevenção da toxoplasmose para uso em humanos é brevemente discutida, mas não está disponível uma que seja efetiva na diminuição da infecção em animais de consumo humano, ou até mesmos em felinos domésticos, que bloquearia a principal via de transmissão para o homem (Bhopale, 2003).

Nosso grupo tem avaliado uma vacina para toxoplasmose utilizando taquizoítos de *T. gondii* irradiados. Hiramoto et al. (2002) mostraram que camundongos imunizados com parasitas irradiados apresentaram altos níveis de proteção contra desafios com cepas cistogênicas. Em estudos mais recentes, foi possível atingir índices semelhantes de proteção utilizando esses parasitas irradiados, mas administrados por via oral com hidróxido de alumínio, fornecendo em animais uma imunidade semelhante à infecção natural (Galisteo, 2004).

Uma vacina por via oral seria de grande importância, pois é através desta que ocorre a contaminação tanto nos hospedeiros definitivos como nos intermediários. Seu uso, destinado principalmente aos felinos, seria uma rota importante para impedir a transmissão da doença para outros animais, evitando a contaminação ambiental.

Nosso desenvolvimento de uma vacina para a toxoplasmose, utilizando taquizoítos esterilizados por radiação gama, permite ainda mais um tipo de interação, uma vez que a imunização por estes agentes não promove infecção, mas induz a um padrão de resposta similar à infecção natural, sem cistos residuais, permitindo a dissecção da imunidade contra a doença e contra os cistos.

3.4.4 Avaliação de vacinas na toxoplasmose – uma visão crítica.

A maioria dos autores procura avaliar a vacinação da toxoplasmose pela produção de anticorpos específicos ou pelo desafio com o agente. Inicialmente, a

maioria dos estudos trabalhava com a cepa RH, do tipo I, de altíssima virulência para camundongos. Assim, estudos iniciais apenas mediam a produção de anticorpos específicos por vários métodos e tentavam avaliar a sobrevida dos animais desafiados pela cepa RH, que é considerada letal numa dose resposta de 10 taquizoítos por animal (Hiramoto et al., 2002). Nesta fase, a meta era a procura da proteção total, ou seja, a capacidade de evitar completamente a infecção, mas as vacinas testadas apenas resultavam em proteção parcial ou aumento de sobrevida, ou, no caso de vacinas atenuadas, acabavam causando mortalidade significativa nos vacinados (Waldeland e Frenkel, 1983). A partir destes estudos e de outros conflitantes com vacinas recombinantes, passou-se a utilizar no desafio apenas uma cepa de menor virulência e produtora de cistos, avaliando quantitativamente a infecção pelo numero de cistos cerebrais, sendo esta a abordagem mais utilizada atualmente. Esta proteção na realidade é dirigida apenas contra a doença, não contra a infecção (Hiramoto et al., 2002). Este conceito adquiriu maior importância quando o uso comercial de vacinas atenuadas em ovelhas resultou em impacto econômico em animais lanígeros (TOXOVAX®, Schering-Plough, Walton, Greater London, Inglaterra), onde não é importante o consumo posterior das carnes dos animais.

Mais recentemente, tentativas esporádicas de vacinas orais ou nasais tem tido resultados promissores (Galisteo, 2008; Igarashi et al., 2008), mas estes estudos sempre usam um desafio uniforme com cepa mais benigna. A avaliação ideal de uma vacina para a toxoplasmose deveria ser feita sobre diferentes desafios e visando avaliar tanto a imunidade protetora contra a infecção como contra a doença. Uma abordagem integrada destes aspectos é mandatória, já que o vacinado deverá encontrar diferentes cepas desafiantes de *T. gondii* e precisa estar protegido contra todas elas. Não existem estudos com esta abordagem sistemática, nem com uma visão global da resposta imune do animal imunizado, utilizando todos os segmentos desta, como a imunidade mediada por anticorpos ou a cooperação entre células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitas

Foram utilizados taquizoítos de *T. gondii* cepa RH, mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por passagens sucessivas e com intervalos de 3 a 4 dias, em camundongos Swiss (não-isogênicos) ou C57BL/6J (isogênicos). Os animais previamente infectados foram sacrificados por asfixia em câmara de CO_2, e o peritônio do animal foi lavado com 5mL de solução salina ou salina tamponada com fosfato - NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS). Após a contagem em câmara de Neubauer, os taquizoítos foram diluídos apropriadamente e cada animal recebeu 10^7 taquizoítos, por inóculo intraperitonial (i.p.).

As cepas cistogênicas de *T. gondii* ME-49 (gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Fausto Araújo - UCLA) e as P e VEG (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Hélio Langoni - UNESP), foram mantida no Laboratório de Protozoologia (IMTSP/USP), por passagens sucessivas e com intervalos de 30 a 45 dias em camundongos Swiss e C57BL/6J. Animais cronicamente infectados foram rapidamente sacrificados por asfixia em câmara de CO_2 e os cérebros macerados em solução salina ou PBS 0,01M pH 7,2 estéril. Uma alíquota da suspensão cerebral (20μL) foi examinada para contagem do número de cistos em microscopia óptica convencional e cada camundongo recebeu 10 cistos em diluição apropriada em solução salina por via oral.

4.2 Animais Experimentais

Para os experimentos de imunização, foram utilizados camundongos machos isogênicos C57BL/6J e BALB/c, todos com peso entre 20 e 22g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de plásticos com maravalha de pinho autoclavada, receberam ração comercial Nuvital® (Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratórios (Clark, 1996) e com os "Princípios de Ética em

Experimentação de Animal" - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.3 Obtenção de antígenos de *T. gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* foram obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente infectados e foram submetidos à sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester®, Rochester Inc., New York, USA), a 40 ciclos por 5-10 períodos de 30s em banho de gelo, até lise completa dos agentes. Em seguida, foi acrescentado solução de NaCl 0,3M para isotonizar a suspensão e, após, submetido à centrifugação a 10.000*g* por 30min a 4 ºC, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno (Camargo et al., 1978). A proteína total foi determinada por método de Bradford, utilizando gama-globulina humana como padrão (Bradford, 1976). As alíquotas foram mantidas a –80 °C até o momento dos ensaios de ELISA.

4.4 Irradiação

Para obtenção das preparações vacinais, foram utilizados taquizoítos de *T. gondii* obtidos de animais previamente infectados, em meio de cultura, mantido em banho de gelo e submetidos à irradiação, na dose de 255Gy com blindagem de 70%, pela exposição a raios-γ de uma fonte de ^{60}Co (Gammacell®, Atomic Energy of Canadá, Pinawa, Canadá), de forma homogênea, com presença de O_2 e uma taxa de dose de 2,31kGy/h.

Foi acrescentado nas amostras irradiadas um volume de meio de cultura contendo 50% de soro fetal bovino inativado e 10% de DMSO. As amostras foram alíquotadas em tubos plásticos de congelamento numa concentração final de 10^8 taquizoítos/mL e foram mantidos por 24h à temperatura de –80 °C e em seguida foram transferidos para nitrogênio líquido (–196 °C), permanecendo até o momento do uso (Hiramoto et al., 2002).

4.5 Imunização dos animais

Camundongos C57BL/6J e BALB/c foram imunizados por via oral (v.o.) utilizando sonda gástrica e tendo hidróxido de alumínio (Al $(OH)_3$) como veículo (v/v)

para preservar os parasitas do trato digestório (Galisteo Jr, 2004), ou intraperitoneal (i.p.), sem veículo. Esses animais receberam três doses a cada 15 dias com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy.

4.6 Coleta do extrato fecal dos camundongos imunizados

O extrato fecal dos camundongos BALB/c, C57BL/6J foi coletado três vezes na semana durante o período de imunização. Os animais foram mantidos por 40 minutos em gaiolas plásticas sem maravalha para a obtenção das fezes. Após esse período, as fezes foram pesadas, colocadas em 5mL de PBS com 0,2% de PMSF 100mM e mantidas em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, foram homogeneizadas e mantidas por mais 15 minutos em banho de gelo. Após essa etapa, foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 2800RPM por 20 minutos. Concluída a centrifugação, foi recolhido o sobrenadante e armazenado a -80 °C. Antes do uso, o extrato fecal dos camundongos imunizados foi precipitado com sulfato de amônia saturado antes da realização do ensaio imunoenzimático.

4.7 Detecção por ELISA de anticorpos específicos no soro e nas fezes dos camundongos imunizados

Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços e sensibilizadas com 100μL de antígeno salino de *T. gondii* (1μg/mL), suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5, *overnight* à 4 °C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20, 0,3% de leite desnatado (PBSTL) e bloqueadas com solução PBSTL durante 1h em estufa a 37 °C. Após o bloqueio, foram depositados na placa 100μL de soro numa diluição 1/100 ou 100μL da solução das fezes precipitadas com sulfato de amônio saturado dos camundongos imunizados e incubados a 37 °C por 1h. As placas foram lavadas cinco vezes com PBSTL e foram aplicados 100μL/poço de diluições de conjugado anti-IgG de camundongo (1:20.000) para o soro ou anti-IgA de camundongo (1:10.000) para as fezes, marcado com peroxidase (Sigma®, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), com uma incubação de 1h à 37 °C. Após novas lavagens (cinco vezes), a revelação da reação foi realizada pela adição de 100μL/poço de OPD (*O*-

fenilenodiamina 1mg/mL, H_2O_2 0,03% em tampão fosfato-citrato 0,2M, pH 5,0) por 30min e interrompida pela adição de 50μL de HCl 4N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas (Multiskan MS® Labsystems, Vienna, USA) a 492nm.

4.8 Detecção da avidez de anticorpos específicos IgG sérico por ELISA

O ELISA foi realizado da mesma forma como descrito acima, exceto por adicionar 100μl/poço em metade das amostras de solução caotrópica. A Uréia 6M e o restante foram mantidos em PBSTL, com incubação por 15min a 37 ºC. A seguir, após cinco lavagens, foram aplicadas em cada poço 100μL de conjugado anti-IgG de camundongo (1/20.000) marcado com peroxidase e as placas mantidas por 1h a 37 ºC. Após novas lavagem (cinco vezes), a revelação foi feita pela adição de 100μL de OPD (*O*-fenilenodiamina 1mg/mL, H_2O_2 0,03% em tampão fosfato-citrato 0,2M, pH 5,0) por 30min, seguida a estabilização pela adição de 50μL de HCl 4N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas a 492nm.

4.9 In vitro induced antibody production (IVIAP) das células esplênicas e da medula óssea

Placas de cultura de 96 poços (Costar®, Corning Inc, Lowell, USA) foram sensibilizadas com 100μL de antígeno de *T. gondii* (10μL/mL) em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5, em câmera úmida *overnight* á 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBST e bloqueadas com 300μL de PBS com 2% de BSA por 1 hora na estufa 37 °C, após esse período as placas foram novamente lavadas três vezes com PBST. As células esplênicas e da medula óssea foram obtidas de camundongos imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, camundongos cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e camundongos não imunizados. Os órgãos foram dissociados de maneira estéril em fluxo laminar, em meio de cultura RPMI 1640 com drogas (Anfotericina B - 5mg/mL, Penicilina – 500.000UI/mL, Estreptomicina – 200mg/mL e β-Mercaptoetanol). As células isoladas foram centrifugadas 2800rpm por 15 minutos e as células do baço

foram centrifugadas com solução de lise v/v (Cloreto de Amônio 015M, Bicarbonato de Sódio e EDTA 0,5M pH 7,4). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em 1mL de meio de cultura, contadas em câmera de Neubauer e, por fim, ajustadas numa concentração de 10^7 células/mL em meio de cultura RPMI 1640 com drogas. As células foram distribuídas nas placas de cultura sensibilizadas e bloqueadas numa concentração de 10^6 células/poço. Em seguida, acrescentou-se em cada poço 100µL de meio de cultura com 10% de soro bovino fetal e 10µg/mL de antígeno de *T. gondii.* As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO^2 a 37 °C por 3 horas, 4 dias e 6 dias para a adsorção dos anticorpos produzidos. Após esse período, as placas foram lavadas oito vezes com PBST e, em seguida, aplicaram-se 100µL/poço de diluições de conjugado anti-IgG (1: 20.000) de camundongo marcado com peroxidase, com uma incubação de 1h a 37 °C. Após novas lavagens (oito vezes), a revelação da reação foi realizada pela adição de 100µL/poço de cromógeno TMB (100µL – 1mg/mL em DMSO, em tampão acido cítrico 0,1M e fosfato de sódio dibásico 0,2M) por 30 minutos. A reação foi interrompida com acido sulfúrico 1M. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas à 450nm.

4.10 Avidez em *In vitro induced antibody production* (IVIAP) das células esplênicas e da medula óssea

As células foram isoladas e cultivadas como descrito acima, exceto pela incubação por 24 horas para a absorção dos anticorpos produzidos. Após esse período, as placas foram lavadas oito vezes com PBST e, em seguida, adicionou-se Uréia 6M em metade das amostras e o restante foram mantidos com PBST por 15 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas oito vezes e aplicados 100µL/poço de diluições de conjugado anti-IgG (1: 20.000) de camundongo marcado com peroxidase, com uma incubação de 1h a 37 °C. Após novas lavagens (oito vezes), a revelação da reação foi realizada pela adição de 100µL/poço de cromógeno TMB (100µL – 1mg/mL em DMSO, em tampão acido cítrico 0,1M e fosfato de sódio dibásico 0,2M) por 30 minutos. A reação foi interrompida com acido sulfúrico 1M. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas à 450nm.

4.11 Desafio dos camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados com taquizoítos de *T. gondii* com diferentes cepas cistogênicas do parasita

As imunizações foram realizadas em três grupos de camundongos BALB/c e C57BL/6J, desafiados após 15 dias do último inóculo com 10 cistos das cepas estudadas, ME-49, P e VEG por via oral. Os animais-controle também foram desafiados com a mesma quantidade de cisto. Após 30 dias, esses animais foram sacrificados e os cérebros retirados e macerados em salina. A contagem de cistos no cérebro foi realizada por microscopia óptica convencional. Após a contagem de cistos de cada animal, foi calculada a proporção de infecção causada pelo agente, (número de cistos do animal imunizado/média de cistos do animal infectado).

4.12 Análise estatística

A comparação entre valores quantitativos, como porcentagem de avidez, quantidade de anticorpos, número de células produtoras de anticorpos nos diversos grupos, foi feita pelo teste de ANOVA, verificando-se a homogeneidade de variâncias. Na ausência desta, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Utilizaram-se as comparações pós-teste de Bonferroni e de Dunn, respectivamente. Foram consideradas significantes as comparações cuja probabilidade de igualdade for menor que 5% ($p<0.05$). As relações entre os diversos valores quantitativos foram feitas pela correlação de Pearson. Todas as estimativas estatísticas foram feitas utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados

5.1.1 IgG total anti-T.gondii em soro

Para verificar a resposta imune humoral induzida pela imunização com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados, analisamos a produção e a avidez dos anticorpos específicos séricos por ELISA. Os modelos experimentais seguiram o desenho experimental mostrado em Métodos e foi feita coleta de sangue por punção cardíaca no momento do sacrifício, 15 dias após a terceira dose, para a produção de soro. Apresentamos o resultado de um dos 05 ensaios realizados em grupos de 05 animais, com resultados similares. A produção de anticorpos IgG específicos no soro dos animais imunizados, que pode ser vista na figura 3, mostrou que os camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal apresentaram maiores níveis de produção de anticorpos IgG e semelhante aos animais infectados pela cepa ME-49. Nestes animais imunizados por via oral, a produção de IgG sérica foi presente e acima dos controles, porém com níveis baixos. Camundongos C57BL/6J imunizados por via intraperitoneal apresentaram níveis séricos menores de IgG específica, intermediários entre controle e infectados. Neste modelo de camundongo isogênico, os animais imunizados por via oral não mostraram produção significativa de anticorpos séricos, quando comparados aos controles. Estes dados mostram uma produção significativa de IgG nos animais imunizados por via parenteral, com variações dependentes de cada linhagem.

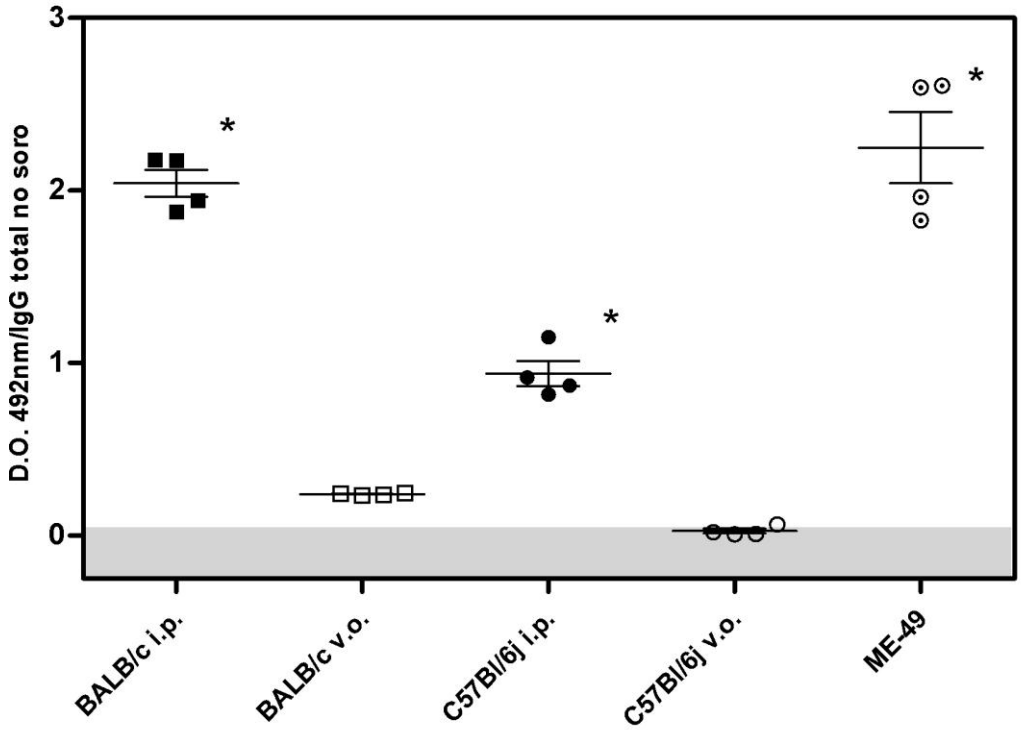

Figura 3 - Detecção de anticorpos IgG total em soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (*p<0,05) significante quanto à infecção sem imunização.

5.1.2 IgG anti T. gondii de alta afinidade ou avidez

As mesmas amostras ensaiadas para IgG específica total também o foram para a detecção de anticorpos de alta afinidade, que são determinadas pela resistência a um agente caotrópico. Este é o resultado de um de dois experimentos similares, com 05 animais em cada grupo, sendo o mesmo experimento apresentado anteriormente. A produção de anticorpos IgG especifica de alta afinidade nos grupos imunizados pode ser observada na figura 4. Camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via intraperitoneal apresentaram níveis significativos de anticorpos de alta afinidade quando comparados a controles, diferente de animais que receberam a imunização por via oral, onde esta produção não foi evidente. Animais infectados com a cepa ME-49 apresentaram níveis elevados de IgG de alta afinidade no soro. Isto mostra que a produção de anticorpos de alta afinidade não é eficiente na imunização por via oral.

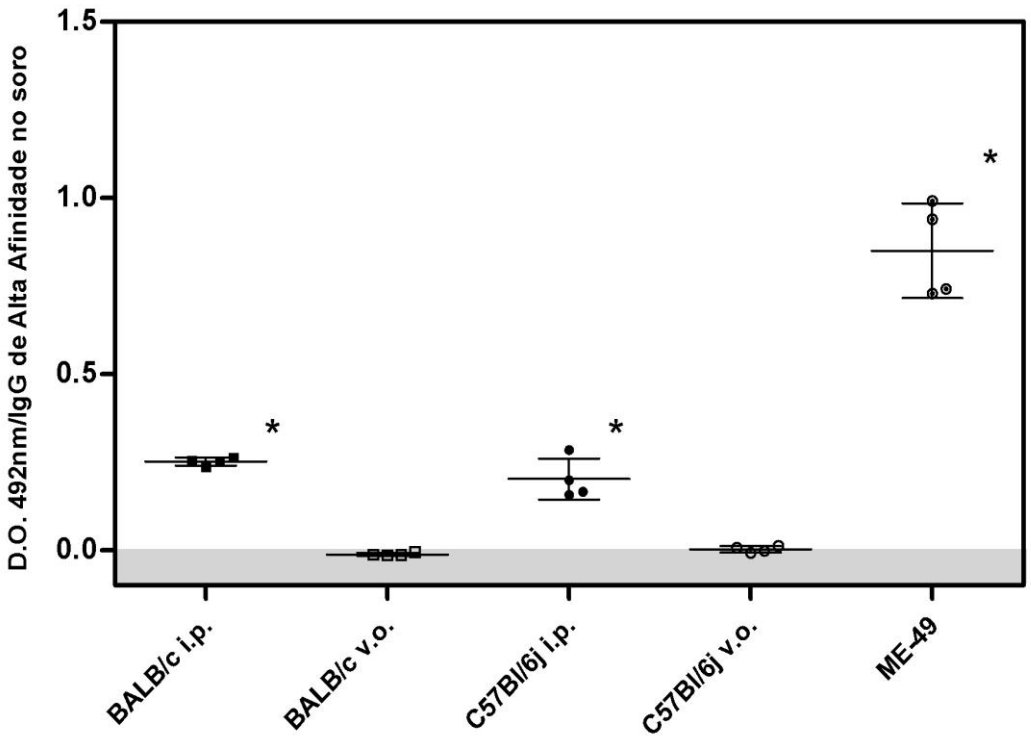

Figura 4 - Detecção de anticorpos IgG de alta afinidade no soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (* p<0,05) significante quanto a infecção sem imunização.

5.1.3 Produção de IgA anti T. gondii no soro

Para verificação da produção de outras classes de imunoglobulinas, procedemos a pesquisa dos níveis séricos de IgA especifica contra *T.gondii* em modelos experimentais de imunização com taquizoítos irradiados, conforme o desenho experimental. A presença de IgA especifica foi determinada em ELISA, como o sistema de detecção disponível era de baixa eficiência, os resultados são apresentados em média da produção e pode ser visto na Figura 5. Camundongos BALB/c imunizados apresentaram níveis mais elevados de IgA sérica específica quando comparamos com os camundongos C57BL/6J, com produção semelhante tanto por via de imunização parenteral ou oral. Animais infectados com a cepa ME-49 apresentaram os níveis mais elevados desses anticorpos no soro. A imunização induz a produção de IgA no soro de forma independente da via de inoculação.

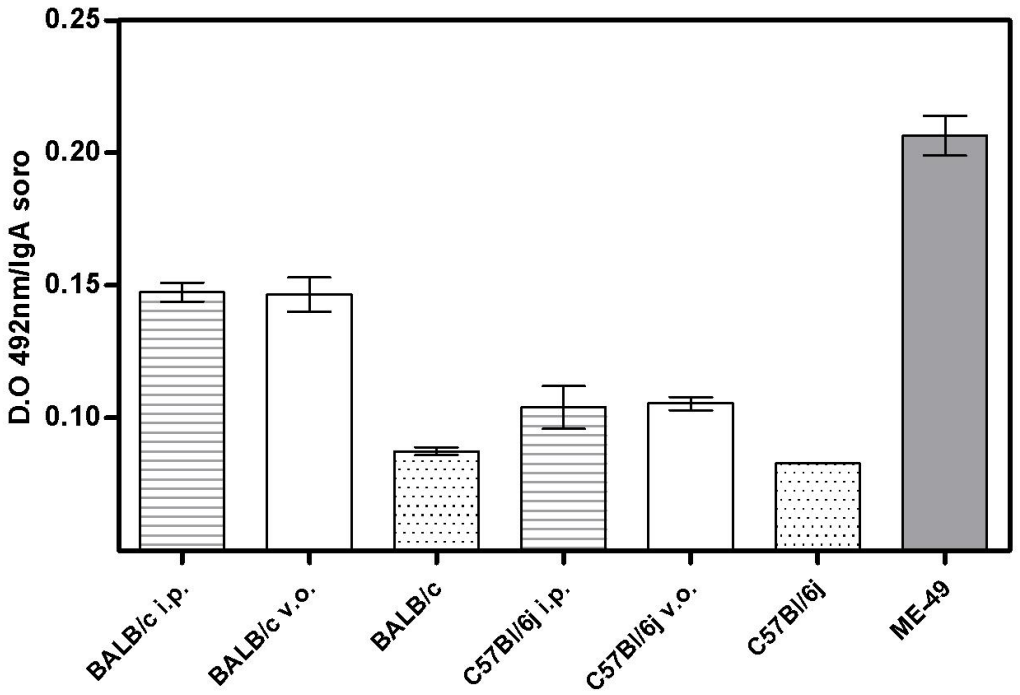

Figura 5 - Detecção de anticorpos IgA no soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral.Barras representam à média e o erro padrão da média.

5.2 Resposta humoral secretora em fezes dos camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados

Para a avaliação da imunidade induzida em nível de mucosas, procedemos à pesquisa de S-IgA nas fezes. Estas foram coletadas de dois grupos experimentais de animais imunizados como descrito em Métodos, durante as várias fases da imunização. As fezes coletadas foram processadas e a suspensão solúvel foi precipitada com sulfato de amônio para concentrar S-IgA e permitir o ELISA quantitativo. A quantificação de S-IgA nas fezes de camundongos imunizados pode ser vista na Figura 6. Foi efetuada também uma análise da evolução da quantidade de S-IgA, através de uma análise de regressão não linear, o que permite estabelecer a quantidade e o patamar de produção. Camundongos BALB/c imunizados por via oral apresentaram maiores níveis de secreção nas fezes de anticorpos S-IgA quando comparamos com a mesma linhagem imunizada por via intraperitoneal, com rápido estabelecimento de patamar de produção. Camundongos C57BL/6J

apresentaram menor secreção de S-IgA e retardo no alcance do patamar de estabiização quando comparados a camundongos BALB/c, sem distinção significativa quanto à via de inoculação do imunógeno.

Notamos também que a medida de S-IgA nas fezes apresenta inúmeras variações experimentais, causadas principalmente pela dependência do volume fecal, composição, aspectos referentes à excreção e por degradação intraintestinal por proteases de bactérias. Apesar destas limitações, é evidente a maior capacidade de instalar este tipo de resposta nos camundongos BALB/c.

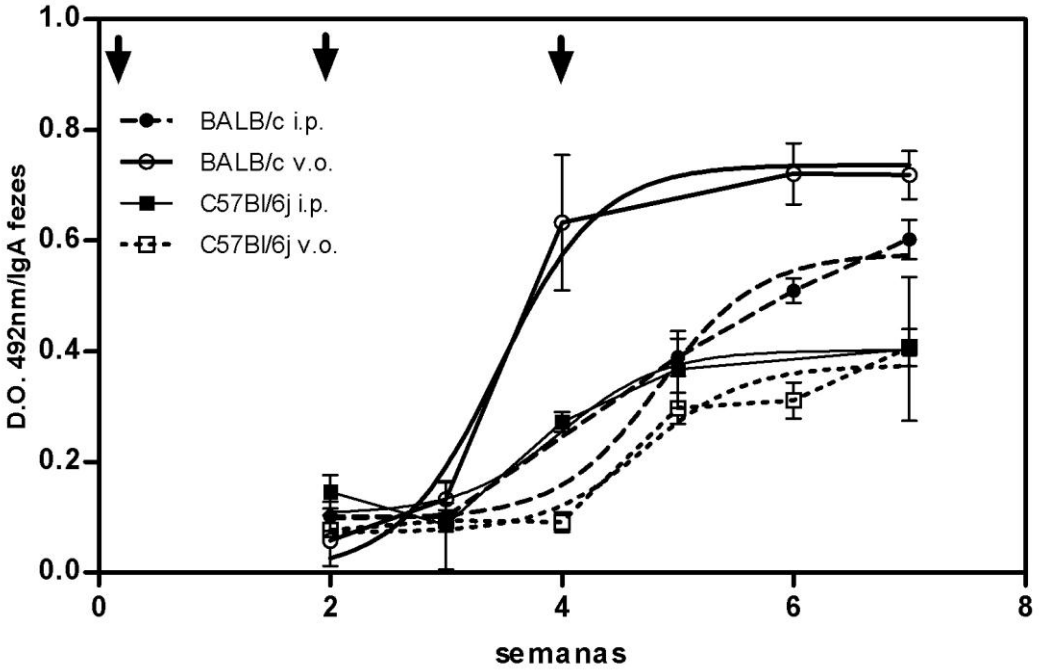

Figura 6 - Produção de anticorpos S-IgA nas fezes dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral. As setas representam as imunizações e a barra representa o desvio padrão da medida. Este é um experimento típico de 03 experimentos executados.

5.3 Produção de anticorpos IgG anti *T. gondii* por células da medula óssea e por células esplênicas em camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados.

A produção de anticorpos IgG anti *T. gondii* por células esplênicas e na medula óssea nos camundongos imunizados e infectados foi avaliada por ensaios de IVIAP. Essa técnica permite a abordagem da produção de anticorpos por células de memória em cultura induzidas por antígeno. O ensaio foi realizado em diferentes tempos, sendo 3 horas de incubação para avaliar a produção de plasmócitos comprometidos com o antígeno sem cooperação celular e por mais tempo, 4 e 6 dias, para avaliar o compromisso de células de memória existentes nesses órgãos.

Os camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados foram sacrificados 15 dias após a terceira dose, o baço e a medula óssea foram removidos e processados em fluxo laminar estéril. Os resultados apresentados representam a associação de 10 experimentos realizados da mesma maneira. Para normalização, todos os experimentos foram ajustados para a produção por número fixo de células, expressado em absorvância do ELISA por milhão de células originais.

Em camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via intraperitoneal e por via oral, observamos na figura 7 que houve uma produção imediata de anticorpos anti *T. gondii* por células da medula óssea e células esplênicas no inicio (3 horas), mostrando que há uma produção de anticorpos independente da cooperação ou crescimento celular.

A produção de anticorpos IgG por células da medula óssea e por células esplênicas em camundongos BALB/c que receberam o imunógeno por via intraperitoneal apresentaram elevados níveis de detecção desses anticorpos quando comparados aos animais imunizados por via oral (Figura 7A e B).

Em camundongos C57BL/6J, notamos que os animais imunizados por via intraperitoneal e por via oral apresentaram níveis semelhantes de produção de anticorpos IgG específicos por células de medula óssea (Figura 7C). Quando observamos a produção de anticorpos por células esplênicas, notamos que houve uma produção maior de anticorpos nos animais imunizados por via intraperitoneal (Figura 7D).

Nas células do baço, diferentemente da medula óssea, observamos maior produção de anticorpos no 6° dia, mostrando que houve uma necessidade de

cooperação celular para um maior número de células comprometidas nesse órgão. Em camundongos C57BL/6J imunizados, houve uma resposta similar com os animais infectados mostrando um número de células de memória semelhante induzidas por imunização ou infecção (Figura 7).

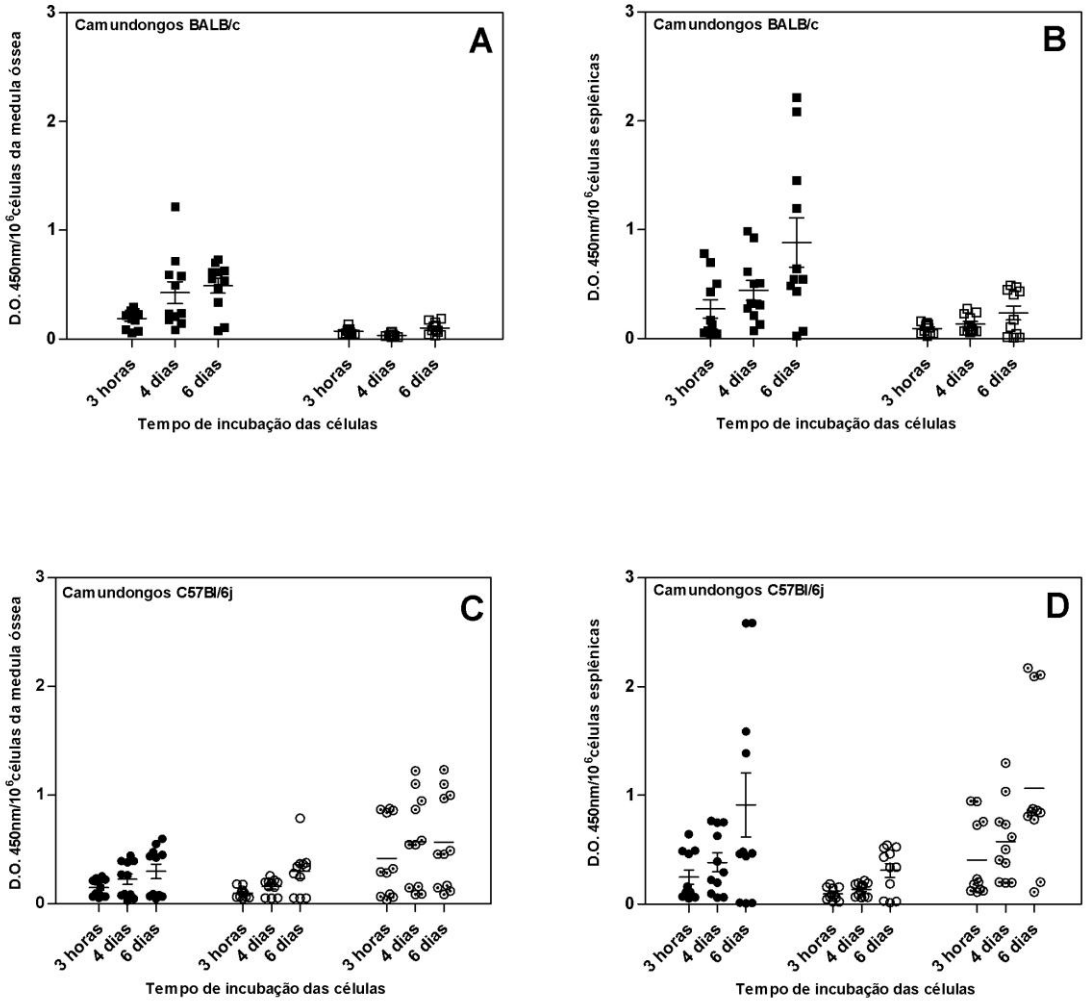

Figura 7 - Detecção de anticorpos IgG por células da medula óssea (A e C) e por células esplênicas (B e D) em camundongos BALB/c (A e B) e C57BL/6J (C e D) imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral. Os símbolos representam cada medida isolada de produção de anticorpos por células da medula óssea e esplênicas. Símbolo sólido: imunização i.p.; Símbolo vazio: imunização v.o.; Símbolo com ponto sem imunização. As barras representam à média e o erro padrão da média.

5.3.1 IgG anti T. gondii de alta afinidade ou avidez produzidos por células da medula óssea e por células esplênicas

Realizamos novos ensaios de IVIAP com o objetivo de avaliar a avidez dos anticorpos IgG anti *T. gondii* produzidos por células da medula óssea e células esplênicas e analisar a resistência dos anticorpos ao antígeno após tratamento com solução caotrópica. O experimento foi executado da mesma maneira que o anterior, exceto pelo tempo de incubação, onde as células da medula óssea e células esplênicas foram incubadas por 24 horas para a absorção dos anticorpos produzidos e, após esse período, os anticorpos foram tratados com solução caotrópica. Utilizamos a mesma técnica de normalização.

Como descrito anteriormente, obtivemos o mesmo tipo de resposta de produção de anticorpos totais nos experimentos. Assim, células da medula óssea dos animais imunizados por via intraperitoneal, tanto camundongos BALB/c (figura 8A) quanto C57BL/6J (Figura 8C) produziram maiores níveis de anticorpos específicos IgG quando comparados com os animais imunizados por via oral.

A mesma produção de anticorpos IgG por células esplênicas foi equivalente nos camundongos BALB/c e C57BL/6J, independente da via de inóculo (figura 8A e C). Nos animais infectados houve um nível maior de produção de anticorpos IgG por células da medula óssea do que a produção de anticorpos por células esplênicas (Figura 8C).

Esses anticorpos, IgG anti *T. gondii,* que foram produzidos por células da medula óssea e do baço em camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via intraperitoneal e por via oral, apresentaram uma alta afinidade com o antígeno, sendo que na infecção apresentaram significativo nível de produção de anticorpos IgG de alta avidez (Figura 8B e D).

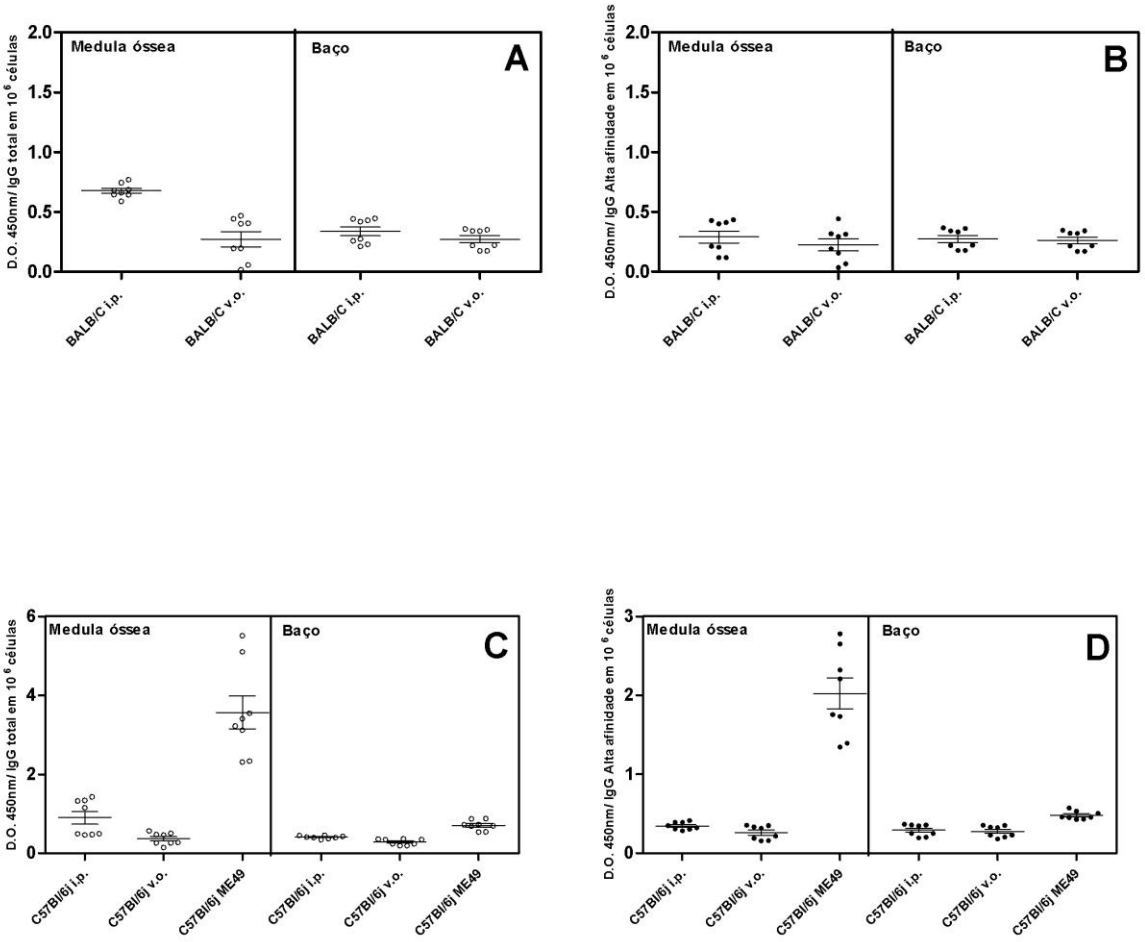

Figura 8 - Detecção de anticorpos IgG total (símbolos abertos – A e C) e de alta afinidade (símbolos fechados – B e D) por células da medula óssea e do baço em camundongos BALB/c (A e B) e C57BL/6J (C e D) imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral e animais infectados com a cepa ME-49. Barras representam à média e o erro padrão da média.

5.4 Proteção dos camundongos imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, após desafio com diferentes cepas cistogênicas.

5.4.1 Proteção quantitativa em camundongos BALB/c imunizados

Os números de cistos de cada cepa encontrados nos camundongos BALB/c imunizados por via oral e por via intraperitoneal pode ser observado na figura 9A. Em camundongos desta linhagem, imunizados e desafiados independente da cepa, houve uma proteção parcial quando comparados aos animais que não receberam a imunização.

Foi calculado para cada grupo a proporção de infecção de cada cepa cistogênica de *T. gondii* utilizado para o desafio dos animais imunizados, como descrito anteriormente em Métodos.

Observamos que na proporção de infecção pela cepa ME-49 tanto os animais imunizados por via oral como por via intraperitoneal apresentaram uma menor infecção comparados àqueles que não receberam o imunógeno (Figura 9B).

A proporção de infecção em animais desafiados com 10 cistos da cepa P mostrou que os camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal apresentaram menor infecção quando comparado àqueles imunizados por via oral (Figura 9C). O desafio com 10 cistos da cepa VEG nos animais imunizados mostraram uma proporção quantitativa de infecção similar na imunização oral e na imunização intraperitoneal (Figura 9D).

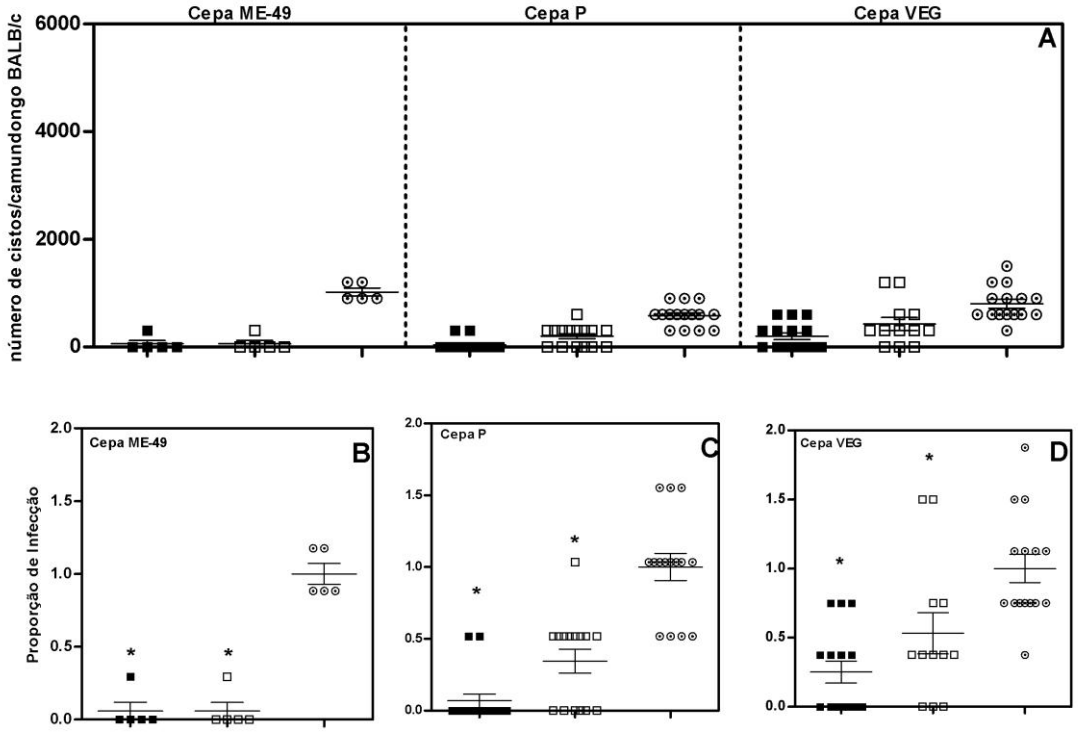

Figura 9 - Números de cistos teciduais (A) de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 e desafiados com 10 cistos de cada cepa. Proporção de infecção em cepa ME-49, (B), cepa P (C) e cepa VEG (D). Os símbolos representam cada medida isolada de cistos em cérebro após 30 dias do desafio. Símbolo sólido: imunização i.p.; Símbolo vazio: imunização v.o.; Símbolo com ponto sem imunização. As barras representam a média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (* $p<0,05$) significante quanto a infecção sem imunização.

5.4.2 Proteção quantitativa em camundongos C57BL/6J imunizados

Na figura 10 observamos a proteção quantitativa em camundongos C57BL/6J imunizados por via intraperitoneal e por via oral. Após a contagem de cistos cerebrais, observamos na figura 10A que essa linhagem apresentou uma quantidade maior de cistos, principalmente nos animais controles que não receberam o imunógeno. Camundongos C57BL/6J imunizados tanto por via intraperitoneal como por via oral também mostraram uma proteção parcial nas três cepas utilizadas para o desafio.

A proporção de infecção foi calculada também para os camundongos C57BL/6J imunizados, do mesmo modo como acima descrito.

Na análise da proporção quantitativa de infecção da cepa ME-49, observamos na figura 10B que tanto camundongos C57BL/6J imunizados por via oral como por via intraperitoneal apresentaram uma menor infecção que os animais infectados sem a imunização. Também observamos uma menor infecção nos camundongos desafiados com 10 cistos da cepa P (Figura 10C) e cepa VEG (Figura 10D), tanto na imunização por via oral como na imunização intraperitoneal.

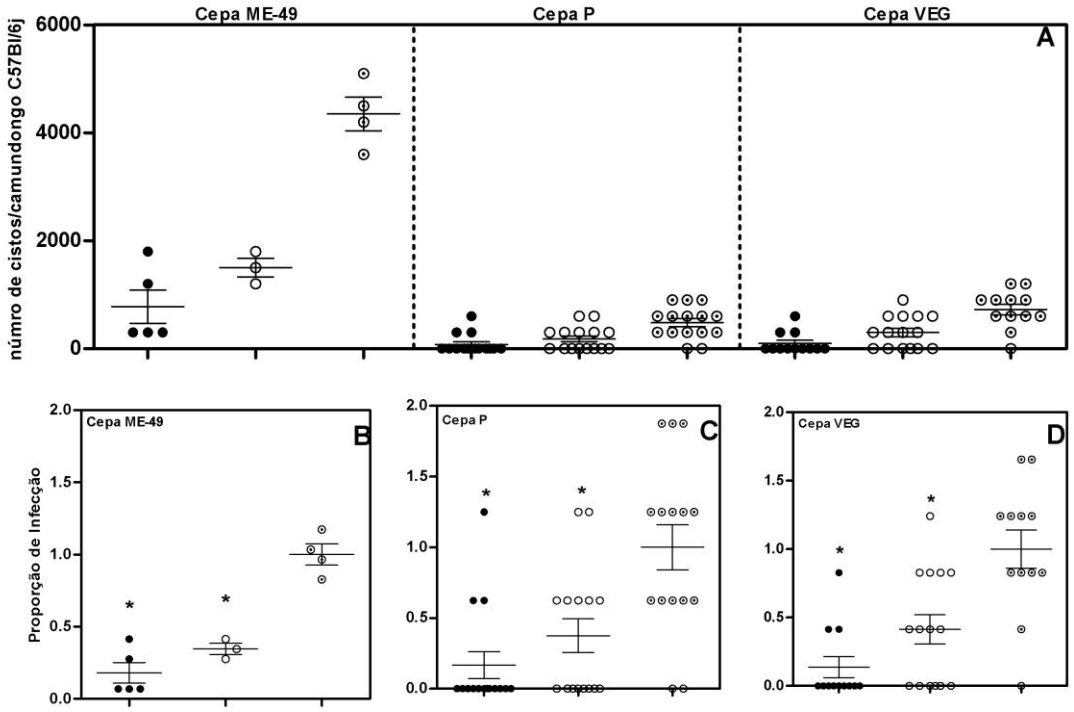

Figura 10 - Números de cistos teciduais (A) de camundongos C57BL/6J imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 e desafiados com 10 cistos de cada cepa. Proporção de infecção em cepa ME-49, (B), cepa P (C) e cepa VEG (D). Os símbolos representam cada medida isolada de cistos em cérebro após 30 dias do desafio. Símbolo sólido: imunização i.p.; Símbolo vazio: imunização v.o.; Símbolo com ponto sem imunização. As barras representam a média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (* $p<0,05$) significante quanto a infecção sem imunização.

5.5 Proteção qualitativa contra desafio em camundongos após imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados.

A proteção contra o desafio pode ser avaliada como números de cistos em cérebro, de forma quantitativa como apresentado no item 5.4, mas também como proteção qualitativa à infecção, pela determinação da freqüência de animais com ausência de cistos em cérebros pesquisados. A análise desta resposta qualitativa pode ser vista na tabela 1.

Como podem ser observados, os ensaios de proteção qualitativa mostram resultados diferentes da proteção quantitativa, expressos pela porcentagem de animais livres de infecção. Camundongos BALB/c imunizados por via oral e por via intraperitoneal mostram proteção significativa nesta análise, independente da cepa desafiante, exceto pelo desafio da cepa VEG nos animais imunizados por via oral.

Nestes animais, houve proteção de 80% quando foram infectados com a cepa ME-49 em ambas as imunizações. No desafio com a cepa P na imunização oral, os camundongos apresentaram uma proteção de 40% e na imunização intraperitoneal uma proteção de 84%. No entanto, quando esses animais foram infectados com a cepa VEG, apresentaram uma proteção de 53% na imunização por via intraperitoneal.

Os camundongos C57BL/6J mostraram suscetibilidade quando desafiados com a cepa ME49, com proteção obtida apenas de forma quantitativa, não havendo animais protegidos da invasão cerebral por cistos. Nas demais cepas, nesta linhagem de camundongos, a imunização peritoneal induz uma significativa proteção, em média 85% dos animais a invasão por cistos da cepa P e entre 75% dos camundongos desafiados com cepa VEG. A proteção pela imunização oral não foi muito efetiva, mas ainda assim mostrou-se marcante nos animais desafiados com a cepa P, obtendo uma proteção de 53%.

Tabela 1 - Distribuição da proteção qualitativa, ou seja, ausência de infecção no desafio, em camundongos imunizados com taquizoítos irradiados e desafiados com 03 diferentes cepas de *T.gondii.*

Cepa	Imunização	Proteção (no infectados/ total desafiado)	
		BALB/c	C57BL/6J
ME-49	----------	0(5/5)	0(4/4)
	Via oral	80%(1/5)*	0(3/3)
	Via intraperitoneal	80%(1/5)*	0(5/5)
VEG	----------	0(15/15)	8%(11/12)
	Via oral	25%(9/12)	40%(9/15)
	Via intraperitoneal	53%(7/15)*	75%(3/12)*
P	----------	0(15/15)	13%(13/15)
	Via oral	40%(9/15)*	53%(7/15)*
	Via intraperitoneal	84%(2/12)*	80%(3/15)*

*p<0.05 pelo teste exato de Fisher, quando comparado ao mesmo animal não imunizado.

5.6 Correlação entre eventos imunológicos e a proteção contra desafio em camundongos após imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados

Avaliamos a relação positiva (r) da média dos resultados da produção de anticorpos IgG anti *T. gondii* total e de alta afinidade no soro, anticorpos IgA anti *T.*

gondii no soro e nas fezes dos camundongos imunizados tanto por via oral como por via intraperitoneal. Também utilizamos os resultados obtidos do IVIAP, calculando a média de produção de anticorpos IgG anti *T. gondii* total e de alta afinidade produzidos por células da medula óssea e por células esplênicas desses animais imunizados.

Esses resultados foram correlacionados com a média de cistos encontrados no cérebro dos camundongos imunizados e desafiados com as cepas cistogênica ME-49, P e VEG, sendo que analisamos a relação contra todos os desafios, em relação à cepa ME-49 e as cepas VEG e P reunidas, como apresentado na tabela 2. Os mesmos avaliadores imunológicos foram também relacionados com a proteção qualitativa, expressão em porcentagem de animais livres de infecção, e podem ser vistos na tabela 3.

Na tabela 2, analisando as relações contra eventos imunológicos estudados e a proteção quantitativa, notamos que a análise pelas 03 cepas não mostram índices significativos de relações entre os eventos imunológicos e proteção. Avaliando cada desafio isoladamente, observamos que a proteção quantitativa contra a cepa ME49 apresentou uma relação significativa com a quantidade de IgA em soro, sem outros eventos imunológicos relacionados. Os desafios com cepas P e VEG apresentaram resultados similares e foram reunidos, mostrando uma relação significativa com a quantidade de IgG total e de alta afinidade em soro e com sua produção por células isoladas de baço e medula óssea, mas sem relação com a proteção de mucosas, evidenciada pela ausência de associação com a quantidade sérica ou em fezes de IgA especifica.

Tabela 2 - Correlação quantitativa preliminar entre eventos imunológicos e o grau de proteção obtido nos experimentos de desafio. Correlação de Pearson estimada e seu intervalo de confiança, para significância unicaudal do modelo. Eventos significantes foram marcados em negrito, NS – não significativo.

Evento	Desafio →	ME-49+VEG+P (12)	VEG+P(8)	ME-49(4)
IgG no soro	r	-0,375	**0,757**	-0,553
	IC95%	-0,736 – 0,153	**0,112 - 0,953**	-0,988 – 0,871
	p	NS	**0,0148**	NS
IgG de alta avidez no soro	r	-0,290	**0,880**	-0,325
	IC95%	-0,690 – 0,244	**0,461 - 0,978**	-0,980 – 0,925
	p	NS	**0,002**	NS
IgA no soro	r	-0,409	-0,079	**-0,904**
	IC95%	-0,754 – 0,114	-0,742 – 0,663	**-0,998 – 0,433**
	p	NS	NS	**0,048**
IgA nas fezes	r	-0,167	-0,538	-0,548
	IC95%	-0,615 – 0,362	-0,901 – 0,268	-0,988 – 0,873
	p	NS	NS	NS
IVIAP em medula óssea	r	-0,152	**0,844**	-0,034
	IC95%	-0,606 – 0,375	**0,343 – 0,971**	-0,963 – 0,958
	p	NS	**0,0042**	NS
IVIAP de alta avidez medula óssea	r	-0,060	**0,789**	0,146
	IC95%	-0,543 – 0,453	**0,190 – 0,96**	-0,962 – 0,960
	p	NS	**0,0099**	NS
IVIAP em baço	r	-0,134	**0,793**	-0,009
	IC95%	-0,594 – 0,391	**0,201 – 0,961**	-0,962 – 0,960
	p	NS	**0,009**	NS
IVIAP de alta avidez em baço	r	0,064	**0,675**	0,374
	IC95%	-0,449 – 0,546	**-0,056 – 0,935**	-0,916 – 0,982
	p	NS	**0,033**	NS

A tabela 3 apresenta as relações contra eventos imunológicos estudados e a proteção qualitativa, sendo que a análise da associação das 3 cepas do desafio também mostrou a ausência de relação de proteção com os eventos imunológicos estudados. A análise isolada do desafio com a cepa ME49 mostrou apenas uma relação com a quantidade de IgA em soro. A análise conjunta do desafio com as cepas P e VEG apresentou as mesmas relações encontradas com a proteção quantitativa para os eventos celulares. Houve também relação com a quantidade de sIgA em fezes. Na proteção qualitativa não houve relação com a quantidade sérica de IgG em soro, embora mantivesse com a quantidade sérica de IgG de alta afinidade.

Tabela 3 - Correlação qualitativa preliminar entre eventos imunológicos e o grau de proteção obtido nos experimentos de desafio. Correlação de Pearson estimada e seu intervalo de confiança, para significância unicaudal do modelo. Eventos significantes foram marcados em negrito, NS – não significativo.

Evento	Desafio →	ME-49+VEG+P (12)	VEG+P(8)	ME-49(4)
IgG no soro	r	0,472	0,619	0,418
	IC95%	-0,139 – 0,823	-0,152 – 0,922	-0,908 – 0,984
	p	NS	NS	NS
IgG de alta avidez no soro	r	0,405	**0,812**	0,076
	IC95%	-0,220– 0,794	**0,251 – 0,965**	-0,955 – 0,966
	p	NS	**0,007**	NS
IgA no soro	r	0,324	-0,287	**0,999**
	IC95%	-0,307 – 0,757	-0,825 – 0,524	**0,939 – 1,000**
	p	NS	NS	**0,0012**
IgA nas fezes	r	0,063	**-0,689**	0,8280
	IC95%	-0,530 – 0,614	**-0,938 – 0,031**	-0,652 – 0,996
	p	NS	**0,029**	NS
IVIAP em medula óssea	r	0,252	**0,869**	-0,317
	IC95%	-0,376 – 0,721	**0,425 – 0,976**	-0,979 – 0,926
	p	NS	**0,0025**	NS
IVIAP de alta avidez medula óssea	R	0,166	**0,854**	-0,490
	IC95%	-0,451 – 0,676	**0,376 – 0,973**	-0,986 – 0,890
	P	NS	**0,0035**	NS
IVIAP em baço	R	0,212	**0,837**	-0,372
	IC95%	-0,412– 0,701	**0,322 – 0,970**	-0,982 – 0,917
	P	NS	**0,0048**	NS
IVIAP de alta avidez em baço	R	0,045	**0,789**	-0,690
	IC95%	-0,542 – 0,604	**0,189 – 0,960**	-0,993 – 0,805
	P	NS	**0,01**	NS

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho estudamos a memória da resposta imune humoral em camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados com uma dose 255Gy de Cobalto 60 por duas vias de inóculo, por via intraperitoneal e por via oral e sua relação com a proteção com desafios de diferentes isolados do agente. A utilização da radiação ionizante para a esterilização do *T. gondii* faz com que a estrutura do parasita permaneça íntegra e suas proteínas inalteradas (Hiramoto et al., 2002). Esse tipo de imunógeno expõe o hospedeiro ao agente com uma imunidade similar à infecção natural. A radiação é uma fonte importante para esterilizar o agente e induzir uma alta imunidade durante sua vida útil no hospedeiro que, desse modo, não consegue chegar à fase de maturidade, associada à doença. A imunização por radiação ionizante já foi utilizada com outros parasitas, como *Schistosoma mansoni*, onde cercárias irradiadas induziram uma imunidade eficiente no hospedeiro (Wales e Kusel, 1992). Em *Giardia Lamblia,* a radiação inativa os cistos, perdendo a sua virulência (Sundermann e Estridge, 2010). Nosso modelo, utilizando parasitas irradiados, apresenta características ideais para o estudo de imunidade sem agentes viáveis.

Houve uma resposta imune humoral especifica utilizando ensaios imunoenzimáticos, com uma resposta especifica ao agente com produção de anticorpos IgG e IgA anti *T. gondii* no soro dos camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados. Camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal apresentaram maiores níveis de produção de anticorpos IgG anti *T. gondii.* Quando comparados com outra via de inóculo, esses animais imunizados apresentaram uma produção de anticorpos similar aos animais infectados com a cepa cistogênica ME-49. Camundongos C57BL/6J também imunizados por via intraperitoneal produziram níveis significativos de IgG séricos, embora em menor quantidade. A resposta humoral sérica foi avaliada também com imunoglobulinas de outras classes, como a IgA anti *T. gondii,* e a produção desses anticorpos no soro dos animais imunizados foi similar nos camundongos BALB/c e C57BL/6J, independentemente da via de inóculo do imunógeno. A maioria dos estudos de resposta imune humoral são avaliados em camundongos imunizados com proteínas recombinantes de fácil obtenção com o avanço da biologia molecular, como as proteínas de superfície, denominadas de SAGs (Letscher-Bru et al., 2003),

ou proteínas associadas a invasão celular, denominadas ROPs, RONs, MICs e GRAs (Dlugonska, 2008), consideradas os principais antígenos para o hospedeiro. Estas imunizações provocam diferentes tipos de proteção, de acordo com a linhagem isogênica do camundongo desafiado (Jongert et al., 2009) e, as vezes, com proteção parcial (Igarashi et al., 2008). Camundongos imunizados com proteínas recombinantes isoladas apresentam baixa proteção contra uma reinfecção e não há redução do número de cistos cerebrais (Jongert et al., 2008). Além disso, proteínas recombinantes geralmente precisam estar associadas a adjuvantes, que ativam o sistema imunológico (Golkar et al., 2007) e, consequentemente, a produção de anticorpos específicos para determinada proteína. Nosso modelo de imunização não utiliza adjuvantes, sendo que taquizoítos de *T. gondii* irradiados induzem uma imunidade ao hospedeiro similar à infecção (Hiramoto et al., 2002) e uma proteção contra diferentes cepas após desafio. Esses fatos corroboram os achados por outros autores, onde a administração oral ou intraperitoneal de taquizoítos de *T. gondii* irradiados promove uma resposta específica contra o parasita, com produção de anticorpos específicos IgG e IgA no soro e uma proteção ao animal imunizado (Galisteo Jr., 2004).

Nossos dados mostraram que além da produção de anticorpos IgG séricos específicos, estes apresentavam uma alta afinidade ao antígeno. Nos modelos de imunizações utilizadas nesse trabalho, encontramos níveis significativos de produção de anticorpos IgG de alta afinidade no soro de animais que receberam o imunógeno por via intraperitoneal, tanto camundongos BALB/c como C57BL/6J, sendo que a qualidade dos anticorpos séricos foi semelhante à infecção. A produção de anticorpos de alta afinidade induzidos pela exposição a um antígeno é importante para a proteção contra uma reinfecção e para a imunidade do hospedeiro por longo tempo (Brink et al., 2008). Estudos realizados com indivíduos HIV positivos apresentaram uma dificuldade e uma deficiência em características qualitativas da resposta imune humoral à vacinação ou infecção pelo vírus do Sarampo (MV) (Nair et al., 2009). A presença de anticorpos de alta afinidade no nosso modelo vacinal sugere a indução de imunidade eficiente contra o patógeno.

Nossos estudos preliminares de imunidade intestinal mostraram uma resposta imune especifica nesta região, com secreção de anticorpos IgA anti *T. gondii* nas fezes dos camundongos imunizados com taquizoítos irradiados. Houve um aumento da produção desses anticorpos nos camundongos BALB/c imunizados por via oral. A

imunização por via oral é de grande importância para estudos de vacinação para toxoplasmose, sendo a principal via de infecção pelo agente, e a mucosa intestinal o primeiro contato com o hospedeiro (Buzoni-Gatel et al., 2006). Foi descrito por Mack e McLeod (1992) que anticorpos S-IgA humanos reduziram a infecção em enterócitos *in vitro*. A secreção de anticorpos IgA é uma das principais vias de reconhecimento antigênico, sendo importante na defesa contra a entrada de patógenos na mucosa intestinal (Cerutti e Rescigno, 2008). Estudos de imunidade de mucosa relatam que a administração de antígenos isolados não é suficiente para induzir uma resposta imune humoral eficaz, porém, com a utilização de adjuvantes, essa imunidade pode aumentar significamente (Debard et al., 1996). A toxina colérica (CT) e enterotoxina termolábil são consideradas fortes adjuvantes da mucosa e, portanto, necessárias para a ativação da resposta imunológica (Reed et al., 2009). Bonenfant et al. (2001) mostraram que camundongos imunizados por via nasal com proteínas SAG1 purificadas associadas à enterotoxina termolábil não tóxica, induziu uma resposta especifica tanto na mucosa como sistêmica, com produção de anticorpos IgG e IgA específicos. Nosso modelo de imunização por via oral com o hidróxido de alumínio mantém a imunogenicidade do antígeno (Ulanova et al., 2001) e protege os parasitas do pH gástrico para chegar à mucosa intestinal preservados. Essa imunização já foi mostrada em camundongos que receberam taquizoítos de *T. gondii* irradiados desenvolveram uma resposta imune na mucosa intestinal e a presença desses parasitas manteve-se intacta nessa região (Galisteo Jr., 2008). Nosso ensaio de imunização mostrou a presença de uma resposta imune na mucosa intestinal com produção de anticorpos específicos nas fezes dos animais imunizados em ambas via de inóculo.

No modelo de imunização estudado, avaliamos a produção de anticorpos anti *T. gondii* por células esplênicas de memória por IVIAP. Camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados com taquizoítos *T. gondii* irradiados por via oral e por via intraperitoneal, produziram níveis significativos de anticorpos IgG específicos por células esplênicas, com maiores níveis de anticorpos em animais imunizados por via intraperitoneal. Outros autores relataram a presença de produção de anticorpos específicos por células B de memória no baço de pacientes vacinados com vírus vaccínia. Essas células produziram anticorpos específicos mesmo após décadas da vacinação, com redução de células de memória em pacientes esplenectomizados, mas não perda total de circulação dessas células e produção de anticorpos

específicos (Mamani-Matsuda et al., 2008). Nossos dados mostraram que ambas as linhagens de camundongos imunizados, independentemente da via do inóculo, apresentaram células esplênicas de memória com produção de anticorpos anti *T. gondii* após 15 dias da ultima dose. Foi possível notar essa produção de anticorpos em 3 horas de ensaio, mostrando que a imunização induz uma memória nesse órgão com células comprometidas e com o antígeno, demonstrando que no decorrer dos dias essa produção de anticorpos IgG específicos aumentam significamente.

Nossos dados também indicaram que na medula óssea ocorre uma resposta especifica ao agente, sendo que células dessa região em camundongos BALB/c e C57Bl/6, imunizados tanto por via oral como por intraperitoneal, após 15 dias da ultima dose, apresentaram níveis significativos de anticorpos anti *T. gondii*. A resposta imune humoral na medula óssea pode ser observada em camundongos esplenectomizados e camundongos deficientes de linfotoxina-alfa (não apresentam linfonodos e nem placas Peyer). Esses animais foram desafiados com *Salmonella typhimurium* e detectaram-se células produtoras de anticorpos específicos em sua medula óssea (Cariappa et al., 2007). Outros autores discutem que os eventos imunológicos para induzir uma memória se localizam em órgãos linfoides secundários, mas também ocorre uma recirculação dessas células para a medula óssea, sendo considerada de grande importância na indução da resposta imune humoral (Pillai e Cariappa, 2009). Nossos dados sugerem que a medula óssea, além de ser um órgão linfóide primário, pode ser um importante órgão linfóide secundário com presença de células B de memória com produção de anticorpos específicos.

A qualidade dos anticorpos mostrou uma alta afinidade com o antígeno por células da medula óssea e esplênicas por IVIAP de camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via oral e por via intraperitoneal. A produção de anticorpos por essas células foram similares à produção de anticorpos por células do baço e da medula óssea de camundongos infectados com a cepa ME-49, mostrando que a resposta imune humoral na vacinação é semelhante com a resposta da infecção, sendo que a produção de anticorpos de alta afinidade é encontrada em maiores níveis em animais infectados. A presença de células de memória é um componente importante para imunidade humoral a longo prazo (Mamani-Matsuda et al., 2008). A afinidade dos anticorpos depende da ativação das sinapses imunológicas durante a maturação da resposta do antígeno especifico, sendo de grande importância no processo de produção de células B de memória e células produtoras de anticorpos

específicos de alta afinidade (McHeyzer-Williams e McHeyzer-Williams, 2005). A capacidade de um imunógeno ativar a cascata de processos imunológicos, gerando a produção de células de memória e de células produtoras de anticorpos por longa vida, explica o sucesso das vacinas utilizadas atualmente (Goins et al., 2010). Nosso modelo vacinal induz uma resposta imune humoral de memória com produção de anticorpos de alta afinidade por células da medula óssea ou esplênicas em camundongos BALB/c e C57BL/6J em ambas as vias de inóculo utilizadas.

Outra forma de elucidar essa resposta de memória é através da técnica do ELISPOT, que permite determinar o número de células responsivas a um antígeno (Baxendale et al., 2010).O ELISPOT depende da homogeneidade de epítopos para a detecção do número de células ao nível da resolução atual (Kalyuzhny, 2009), sendo que para avaliar uma resposta especifica há necessidade de purificação de uma determinada proteína especifica ao agente (Sedgwick, 2005). Nossos ensaios de ELISPOT com extratos antigênicos totais e células esplênicas e de medula óssea não mostraram resultados identificáveis no nível de detecção atual. Isto se deve à multiplicidade de epítopos no extrato total, não havendo densidade de um epítopo suficiente para permitir a identificação da produção de IgG especifica por células isoladas. Para a realização dessa técnica, há necessidade do uso de proteínas purificadas ou recombinantes do agente para obter uma resposta especifica por ELISPOT (Tuaillon et al., 2006). Estudos recentes utilizam essa técnica para avaliar uma resposta com produção de anticorpos a proteínas específicas, como resposta de células B de memória para Toxoíde Tetânico em células de amígdalas humanas, avaliando a resposta imune de memória com uma variedade de antígenos relacionados (Cao et al., 2010). Nesse mesmo estudo, os autores comparam os resultados achados no ELISPOT com o ELISA do sobrenadante da cultura, de certa forma um IVIAP, utilizando a produção de anticorpos com mesmo tipo celular, mostrando uma alta similaridade nos resultados. O IVIAP permite verificar células responsivas ao antígeno com produção de anticorpos *in vitro* em cultura celular de curto ou em longo prazo na presença do antígeno. Alguns autores avaliaram essa técnica para detecção de anticorpos IgG específicos produzidos por linfócitos do sangue periférico de pacientes com estado indeterminado de infecção por HIV-1, pois o IVIAP permite analisar o estado sorológico real do paciente. Essa técnica é facilmente reproduzida e mostra uma melhoria no diagnostico precoce (Bellei et al., 1996). Estudos mais recentes mostraram a eficácia do IVIAP em pacientes com

infecção crônica por vírus da hepatite C (HCV) e determinam, eventualmente, informações complementares sobre a atividade da doença, a resposta do paciente ao tratamento e o monitoramento da infecção não só por HCV como para outros patógenos. A produção de anticorpos por IVIAP reflete a estimulação antigênica persistente do sistema imunológico, provavelmente induzida pela infecção ou imunização (Oliveira et al., 2003). A utilização do IVIAP em dois órgãos centrais da resposta imune humoral mostra que a imunização com taquizoítos *T. gondii* irradiados em camundongos induzem uma memória celular que caracteriza uma circulação de células de memória produtoras de anticorpos específicos tanto na medula óssea como no baço.

Para verificar a proteção induzida pela imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, desafiamos os camundongos imunizados com diferentes cepas cistogênicas do parasita. A proteção pode ser medida na toxoplasmose contra a infecção de forma qualitativa (ausência do agente) ou contra a doença de forma quantitativa (menor número de agentes no hospedeiro), como descrito (Dziadek et al., 2009). Avaliando a proteção quantitativa, camundongos BALB/c, imunizados tanto por via oral como por via intraperitoneal com taquizoítos *T. gondii* irradiados e desafiados com a cepa ME-49, apresentaram uma menor quantidade de cistos no cérebro, quando comparamos com os camundongos que não receberam a imunização, podendo ser normalizada para uma proporção de infecção menor em relação ao animal controle. Na proteção quantitativa dos camundongos BALB/c imunizados e desafiados com a cepa P e VEG também houve uma proteção em relação ao animal infectado. Camundongos infectados com a cepa ME-49 (tipo II) apresentam uma virulência maior em relação às outras cepas, tanto VEG como P (tipo III). Podemos observar que essas cepas VEG e P apresentam uma resposta similar e características semelhantes, pois a infecção por cepa do tipo II apresenta uma patologia e mortalidade maior em camundongos do que animais infectados com as cepas do tipo III (Sibley, 2009). Nossos ensaios mostram que a cepa ME-49 apresenta maior virulência em relação às outras cepas estudadas, como foi demonstrado por outros autores (Pena et al., 2008).

Nos camundongos C57B/6j imunizados tanto por via oral como por via intraperitoneal e desafiados com a cepa ME-49 também houve uma proteção quantitativa de menor intensidade. A proteção quantitativa também é observada em camundongos C57BL/6J imunizados e desafiados com cepas P e VEG,

independentemente da via do inóculo. Camundongos C57B/6j apresentam maiores números de cistos cerebrais, devido a sua suscetibilidade à infecção por *T. gondii,* no entanto, camundongos BALB/c apresentam menores números de cistos devido à resistência a infecção (Williams et al., 1978). Outros autores também relataram que camundongos C57BL/6J são mais suscetíveis à infecção pelo parasita com número maior de cistos cerebrais do que camundongos BALB/c (Fux et al., 2003). Takashima et al. (2008) mostraram que camundongos C57BL/6J infectados com taquizoítos marcado com fluoresceína foram detectados cistos no cérebro desses animais no quarto dia, enquanto nos camundongos BALB/c não foram encontrados cistos marcados.

Na proteção contra a infecção, apesar da alta virulência causada pela infecção por cepa ME-49, os camundongos BALB/c imunizados tanto por via oral como por via intraperitoneal apresentaram 80% de proteção, semelhante à cepa P. Os camundongos C57BL/6J imunizados e desafiados mostraram uma suscetibilidade total a infecção por cepa ME-49, com proteção parcial nos camundongos imunizados por via intraperitoneal e desafiados com cepa P e VEG, que apresentam 80% e 75% de proteção, respectivamente. Há vários estudos sobre vacina para toxoplasmose que avaliam uma proteção induzida pela imunização através de desafios. Na revisão realizada por Jongert e colaboradores (2009), foram comparados diferentes modelos vacinais e desafios, reunindo os trabalhos sobre vacinas para toxoplasmose utilizando diversos modelos, como parasitas vivos ou atenuados (Buxton et al., 1991), inativados (Pettersen, 1988), antígenos brutos ou purificados (Brinkmann et al., 1993), antígenos recombinantes (Jongert et al., 2008), plasmídeo (Xue et al., 2008) ou a até mesmo utilização de vetores vivos ou atenuados (Cong et al., 2005). A maioria dos estudos usa apenas uma forma de definir a proteção sem avaliar a proteção qualitativa em camundongos, mas apresentam diferentes graus de imunidade e redução da carga parasitaria no cérebro. Para preparação de um modelo vacinal para toxoplasmose é necessário visar pontos estratégicos, não apenas a sobrevivência ou menor infecção, mas abordar uma imunidade protetora de forma total. O desafio oral simulando a infecção, o uso de mais de um tipo de cepa do parasita para o desafio e diferentes linhagens de camundongos devem ser preconizadas para verificar a eficácia da imunização em situações genéticas distintas (Jongert et al., 2009). Nosso modelo vacinal, com a utilização de taquizoítos de *T. gondii* irradiados, além de induzir uma

imunidade protetora contra diferentes cepas cistogênicas do agente, mostra a redução de números de cistos cerebrais e, em alguns casos, como em camundongos BALB/c imunizados e desafiados com a cepa ME-49, a redução total de cistos pela microscopia convencional, induzindo uma resposta imune de memória em dois órgãos do sistema imunológicos estudados, com produção de anticorpos de alta afinidade e uma resposta similar à infecção natural.

Através de correlações estatísticas, procuramos elucidar quais dos eventos imunológicos estudados se relacionavam com os tipos de proteção encontrados. Segundo Plotkin, a determinação da correlação entre proteção e eventos é, frequentemente, a primeira etapa para o desenvolvimento de uma vacina contra uma doença. Geralmente as vacinas atuais são avaliadas pela indução de anticorpos no soro ou na mucosa, onde o objetivo é bloquear ou interferir na infecção, com poucos estudos funcionais no sentido da neutralização do agente (Plotkin, 2008). A maioria dos estudos sobre vacinas para toxoplasmose não fazem esse tipo de analise (Jongert, 2009), baseando-se geralmente na produção de anticorpos específicos, tanto sistêmicos como na mucosa, mas não verificam se estes apresentam realmente uma eficácia durante o desafio. Em nosso trabalho, após verificar a resposta induzida pela imunização com taquizoítos irradiados, correlacionamos com a proteção tanto quantitativa como qualitativa dos animais imunizados para verificar os eventos responsáveis pela proteção.

Quando analisamos a correlação da proteção quantitativa com as três cepas cistogênicas utilizadas no desafio com todos os eventos imunológicos, observamos que não houve significância dos eventos pela virulência da cepa ME-49. A correlação quantitativa entre as cepas do tipo III (cepa P e VEG) utilizadas no desafio mostra uma significante produção de anticorpos no soro e por células da medula óssea e do baço, e a produção de anticorpos de alta afinidade tanto no soro como por células da medula óssea e do baço. Quando analisamos a correlação quantitativa somente com os animais imunizados com a cepa do tipo II (ME-9) com os eventos imunológicos, houve significância na presença de anticorpos IgA no soro. Esses resultados sugerem que a presença de anticorpos é importante para impedir a doença, mas não a infecção. Plotkin (2001) descreveu algumas vacinas que protegem o hospedeiro, principalmente através de anticorpos séricos, como vacinas contra tétano (Dokmetjian et al., 1998), doença de Lyme (Steere et al., 1998),

hepatite A (Conrad e Lemon, 1987), raiva (Turner, 1978) e febre amarela (Mason et al., 1973).

A correlação da proteção qualitativa mostrou resultados similares à proteção correlação quantitativa, exceto por apresentar o IgA nas fezes significante no desafio com as cepas do tipo III, além da produção de anticorpos de alta afinidade no soro e a produção de anticorpos por células da medula óssea e do baço. Nossos dados sugerem que a presença de IgA na mucosa intestinal impede a infecção do parasita no hospedeiro, diminuindo a carga parasitaria e, consequentemente, a doença. A presença de células B intestinais produzindo IgA mantém uma relação mutualística com as bactérias. A baixa atividade inflamatória da IgA impede a entrada não só de bactérias como de outros patógenos, sem causar nenhum dano inflamatório no local (Cerutti, 2010). Outros autores também avaliaram a importância da IgA presente na superfície de mucosa em outras doenças como poliomielite (Ogra e Karzon, 1969), rotavírus (Matson et al.,1993) e influenza (Ennis et al., 1982).

Além disso, a produção de anticorpos anti *T. gondii* por células de memória do baço e medula óssea mostrou uma relação importante tanto na proteção quantitativa como na proteção qualitativa. Outros estudos mostraram que camundongos vacinados com taquizoítos de *T. gondii* não virulentos, apresentaram uma maior sobrevida após o desafio com cepa virulenta, sugerindo que a produção de anticorpos específicos por células B protegem "*in vivo*" a infecção, bloqueando a entrada dos taquizoítos nas células hospedeiras (Sayles et al., 2000). A importância de células B de memória também foi demonstrada com a vacinação contra hepatite B (West e Calandra, 1996). O sistema imunológico é complexo e redundante, sendo que uma vacina para proteger o indivíduo deve induzir uma variedade de mecanismos para defender contra o agente invasor. As vacinas atuais mostram principalmente a ação de anticorpos na circulação que impedem a infecção (Plotkin, 2001), mas é de grande importância o estudo de imunidade de mucosas para agentes patogênicos gastrointestinais, como *T. gondii*.

Vacinas para toxoplasmose devem visar à proteção do hospedeiro contra a infecção, impedindo a entrada do parasita nas células hospedeiras, evitando a formação de cistos teciduais e, consequentemente, a doença (Martinez-Gomes et al., 2009). A infecção por *T. gondii* pode implicar em alterações comportamentais do hospedeiro, o que já foi relatado em estudos realizados com camundongos infectados que apresentam uma alteração comportamental, sendo afetada a

coordenação motora e sensorial (Gulinello et al., 2010). Cabe ressaltar que esses animais têm uma afinidade com os felinos, e essa alteração faz com que o parasita entre em contado com seu hospedeiro definitivo para ocorrer a reprodução sexuada (Webster e McConkey, 2010). Essa alteração comportamental também é relatada em pacientes com infecção por *T. gondii*, onde alguns casos apresentaram uma deficiência de reflexo maior que o grupo não infectado (Alvarado-Esquivel et al., 2010). Uma vacina para toxoplasmose não deve induzir este tipo de alteração. Esta restrição é lembrada em estudos de vacinais para humanos, mas não é pertinente em modelos de vacinas para animais, especialmente os felinos.

Nosso estudo, utilizando um modelo de imunização para toxoplasmose, evidenciou uma proteção parcial contra desafios com diferentes cepas cistogênicas do agente. Na imunização com taquizoítos irradiados não há formação de cistos teciduais nos animais e há uma indução da resposta imune similar à infecção. Na toxoplasmose, os felinos são responsáveis em contaminar o ambiente (Dubey, 2004), e o desenvolvimento de uma vacina oral para esses animais é de grande importância para não ocorrer a transmissão da doença para humanos ou outros animais. A vacinação de gatos domésticos não seria difícil. O problema maior da toxoplasmose está nos felinos selvagens, presentes em ambientes de difícil acesso, tornando-se importantes na disseminação da doença. Para vacinar também esses felinos, a vacina poderia ser produzida e distribuída como iscas atrativas. Esse modelo já é empregado com sucesso para a imunização da raiva (RABORAL VR-G®, Rhone Merieux, Inc., Georgia, USA) e são eficientes na imunização de cães, raposas, gatos e outros animais que se localizam em grandes áreas de difícil acesso (Mackowiak et al., 1999). Nossos estudos mostram que a imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados pode ser uma vacina efetiva por via oral para uso em felinos e outros animais, diminuindo a contaminação ambiental e consequentemente a contaminação do homem e dos animais de criação.

Os ensaios realizados neste trabalho foram feito com técnicas relativamente simples e de baixa complexidade, apresentando resultados significativos. Essas técnicas poderiam ser utilizadas em uma única coleta do individuo vacinado para avaliar a resposta imune humoral com produção de anticorpos séricos, assim comoe a memória imunológica, analisando a produção de anticorpos por IVIAP.

Em conclusão, a abordagem aqui utilizada mostrou-se efetiva na determinação da memória imunológica em seus vários aspectos, abrindo

perspectivas para o uso de vacinas com taquizoítos de *T. gondii* irradiados em modelos de prevenção da toxoplasmose animal e quem sabe humana.

7 CONCLUSÃO

Camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via oral e por via intraperitoneal com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados com uma dose de 255Gy induziram uma memória imunológica com produção de anticorpos anti-*T. gondii* por células do baço e da medula óssea com produção de anticorpos específicos séricos.

Específicas

- Camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados por via oral ou por via intraperitoneal com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados induziram uma resposta imunológica com produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* séricos, mais com baixa afinidade;

- Camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados induziram uma resposta imunológica com produção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* séricos;

- Camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados induziram uma resposta imunológica na mucosa, com secreção de anticorpos anti-*T. gondii* IgA nas fezes;

- Células da medula óssea e do baço de camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados produziram anticorpos anti-*T. gondii in vitro*;

- Anticorpos de alta afinidade foram produzidos em ambos os grupos imunizados por células da medula óssea e do baço;

- Camundongos BALB/c e C57BL/6J imunizados induziram uma proteção contra desafios, independentemente do genótipo da cepa.

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular Immunology. 6th ed. Philadelphia, EUA: Saunders; 2007.

Adams GE, Aldrich JE, Bisby RH, Cundall RB, Redpath JL, Willson RL Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions inorganic radical anions with amino acids. Radiat Res. 1972;49:278-89.

Alexander J, Jebbari H, Bluethmann H, Satoskar A, Roberts CW. Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design. Curr Top Microbiol Immunol. 1996;219:183-95.

Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Torres-Castorena A, Estrada-Martínez S, Urbina-Alvarez JD, Ramos-de la Rocha M, Márquez-Conde JA, Dubey JP. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in patients with vision and hearing impairments, cancer, HIV, or undergoing hemodialysis in Durango, Mexico. J Parasitol. 2010 Jun;96(3):505-8.

Amanna IJ, Slifka MK. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. Immunol Rev. 2010 Jul;236:125-38.

Andersson K, Wrammert J, Leanderson T. Affinity selection and repertoire shift: paradoxes as a consequence of somatic mutation? Immunol Rev. 1998 Apr;162:73-82.

Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, Bongiovanni M, Guaraldi G, Grisetti S, Vigo B, Gigli B, Mariano A, Dalle Nogare ER, De Marco M, Moretti F, Corsi P, Abrescia N, Rellecati P, Castagna A, Mussini C, Ammassari A, Cinque P, d'Arminio Monforte A. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2004 Dec;39(11):1681-91.

Appelberg R, Orne I, Pinto MS, Silva M. *In vitro* effects of interleukin-4 on interferon-gamma induced macrophage activation. Immunol. 1992;76:553-9.

*** De acordo com:**
International Committee of Medical Journal Editors. Uniforms requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample reference. Available from: http://www.icmje.org[2007, May 22]

Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, water borne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state. Brazil. Emerg.Infect Dis. 2003;9:55–62.

Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. J Exp Med. 2002;195:1625–33.

Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. Nature. 2001 May;411(6836):489-94.

Baxendale HE, Johnson M, Keating SM, Ashton L, Burbidge P, Woodgate S, Southern J, Miller E, Goldblatt D. Circulating pneumococcal specific plasma and memory B cells in the elderly two years after pneumococcal conjugate versus polysaccharide vaccination. Vaccine. 2010 Oct; 28(42):6915-22.

Bellei N, Granato C, Tomiyama H. Use of the in vitro induced antibody roduction test (IVIAP) to elucidate inconclusive status of HIV-1 infection Diagn Microbiol Infect Dis. 1996 Jun;25(2):65-9.

Bhopale GM Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. Microbes Infect. 2003 Apr;5(5):457-62.

Bonenfant C, Dimier-Poisson I, Velge-Roussel F, Buzoni-Gatel D, Del Giudice G, Rappuoli R, Bout D. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 2001 Mar;69(3):1605-12.

Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976;7(72):248-254.

Brink R, Phan TG, Paus D, Chan TD. Visualizing the effects of antigen affinity on T-dependent B-cell differentiation. Immunol Cell Biol. 2008 Jan;86(1):31-9.

Brinkmann V, Remington JS, Sharma SD. Vaccination of mice with the protective F3G3 antigen of Toxoplasma gondii activates CD4+ but not CD8+ T cells and induces Toxoplasma specific IgG antibody. Mol Immunol. 1993 Mar;30(4):353-8.

Butler J, Hoey BM, Swallow AJ. Radiation chemistry. Annu Rep Prog Chem. 1987;83:29-175.

Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. Vet Rec. 1991;129:89-93.

Buxton D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. Parasitol Today. 1993 Sep;9(9):335-7.

Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. Cell. Microbiol. 2006;8(4):535-44.

Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. Trends Parasitol. 2006 Oct;22(10):448-52.

Caldas LA, de Souza W, Attias M. Calcium ionophore-induced egress of *Toxoplasma gondii* shortly after host cell invasion Vet Parasitol. 2007 Jul;147(3-4):210-20.

Caldas LA, de Souza W, Attias M. Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell Vet Parasitol. 2009;67(1):8-18.

Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linker immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infect Immu. 1978;21(1):55-8.

Candolfi E, Hunter CA, Remington JS. Role of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to Concanavaline A and *Toxoplasma* antigen during acute toxoplasmosis. Infect Immun. 1995;63:751-6.

Cao Y, Gordic M, Kobold S, Lajmi N, Meyer S, Bartels K, Hildebrandt Y, Luetkens T, Ihloff AS, Kröger N, Bokemeyer C, Atanackovic D. An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. J Immunol Methods. 2010 Jun 30;358(1-2):56-65.

Cardi BA, Nascimento N, Andrade Jr. HF. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ^{60}Co gamma rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. Int J Radiat Biol. 1998;73:557-64.

Cariappa A, Chase C, Liu H, Russell P, Pillai S. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. Blood. 2007 Mar;109(6):2339-45.

Cariappa A, Mazo IB, Chase C, Shi HN, Liu H, Li Q, Rose H, Leung H, Cherayil BJ, Russell P, von Andrian U, Pillai S. Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. Immunity. 2005 Oct;23(4)397-407.

Carvalho FR, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Souza MA, Oliveira TC, Béla SR, Faria GG, Lopes CS, Mineo JR. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. Clin Vaccine Immunol. 2008 Aug;15(8):1265-71.

Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. Immunity. 2008 Jun;28(6):740-50.

Cerutti A. Immunology. IgA changes the rules of memory. Science. 2010 Jun;328 (5986):1646-7.

Chumakov K, Ehrenfeld E, Wimmer E, Agol VI. Vaccination against polio should not be stopped. Nat Rev Microbiol. 2007 Dec;5(12):952-8.

Chumakov K, Ehrenfeld E. New generation of inactivated poliovirus vaccines for universal immunization after eradication of poliomyelitis. Clin Infect Dis. 2008 Dec;47 (12):1587-92.

Clark JD. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press; 1996.

Clifford V, Wadsley J, Jenner B, Buttery JP. Mumps vaccine associated orchitis: Evidence supporting a potential immune-mediated mechanism. Vaccine. 2010 Mar;28(14):2671-3.

Cong H, Gu QM, Jiang Y, He SY, Zhou HY, Yang TT, Li Y, Zhao QL. Oral immunizatiom with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 2005;27(1-2):29-35.

Conrad ME, Lemon SM. Prevention of endemic icteric viral Hepatitis by administration of immune serum gamma globulin. J Infect Dis. 1987;156:56–63.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ. 2000 Jul;321(7254):142-7.

Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. Cell. 2006 Feb;124(4):815-22.

Couper KN, Nielsen HV, Petersen E, Roberts F, Roberts CW, Alexander J. DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofoetal transmission. Vaccine. 2003 Jun;21(21-22):2813-20.

Czajka H, Schuster V, Zepp F, Esposito S, Douha M, Willems P. A combined measles, mumps, rubella and varicella vaccine (Priorix-Tetra): immunogenicity and safety profile. Vaccine. 2009 Nov; 27(47):6504-11.

Davis MM, Patel MS, Gebremariam A. Decline in varicella-related hospitalizations and expenditures for children and adults after introduction of varicella vaccine in the United States. Pediatrics. 2004 Sep;114(3):786-92.

Debard N, Buzoni-Gatel D, Bout D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. Infect Immun. 1996 Jun;64 (6):2158-66.

Debard N, Sierro F, Browning J, Kraehenbuhl JP. Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches. Gastroenterology. 2001 Apr;120(5):1173-82.

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation of function of T cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev. 1998;11:569-88.

Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. Clin Microbiol Infect. 2008 Dec;14(12):1089-101.

Dlugonska H. *Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. J Biomed Biotechnol. 2008;2008:632424.

Dokmetjian J, Valle CD, Lavigne V, Eriksson PV, Manghi MA. Relationship between structure and neutralizing activity of rabbit tetanus antibodies elicited by a cellular and whole-cell pertussis DTP vaccines. Vaccine. 1998;16:672–7.

Dubey JP, Brake RJ, Murrell KD, Fayer R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. Am J Vet Res. 1986,47(3):518-22.

Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol. 2008 Sep;38(11):1257-78.

Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of high-temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. parasitol. 1990;76:201-4.

Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna MC, Miska K, Sreekumar C, Kwok OC, Shen SK, Gamble HR. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. J Parasitol. 2005 Oct; 91(5):1082-93.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer C A. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Developmentof Tissue Cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11(2):267-99.

Dubey JP. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. Vet Parasitol. 2006 Aug;140(1-2):69-75.

Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol. 2004 Dec;126(1-2):57-72.

Dubey JP, Thulliez P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Am J Vet Res. 1993 Feb;54(2):270-3.

Dunay IR, Sibley LD. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Opin Immunol. 2010 Aug;22(4):461-6.

Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. Exp Parasitol. 2009 Sep;123 (1):81-9.

Ely KH, Kasper LH, Khan IA. Augmentation of the $CD8^+$ T cell response by IFN-gamma in IL-12 deficient mice during *Toxoplasma gondii* infection. J. Immunol. 1999;162(9):5449-54.

Elyasi H, Babaie J, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Zare M, Sadeghiani G, Assmar M, Pelloux H, Golkar M. Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin Vaccine Immunol. 2010 Sep;17(9):1349-55.

Ennis FA, Yi-Hua Q, Schild GC. Antibody and cytotoxic T Lymphocyte responses of humans to live and inactivated Influenza vaccines. J Gen. Virol. 1982;58:273–81.

Escoffier P, Jeanny JC, Marinach-Patrice C, Jonet L, Raoul W, Behar-Cohen F, Paris L, Danis M, Dubremetz JF, Mazier D. *Toxoplasma gondii*: flat-mounting of retina as a new tool for the observation of ocular infection in mice. Exp Parasitol. 2010 Oct;126(2):259-62.

Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanità, 2004;40(1):71-80.

Forbes LB, Measures L, Gajadhar A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in northern traditional (country) foods prepared with meat from experimentally infected seals. J Food Prot. 2009 Aug;72(8):1756-60.

Frierson JG. The yellow fever vaccine: a history. Yale J Biol Med. 2010 Jun;83(2):77-85.

Fux B, Rodrigues CV, Portela RW, Silva NM, Su C, Sibley D, Vitor RW, Gazzinelli RT. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6392-401.

Galisteo JR AJ. *Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Estudo da imunidade intestinal em camundongos C57BL/6J experimentalmente vacinados com taquizoítos irradiados. [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade São Paulo; 2004.

Galisteo JR AJ. *Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: imunidade humoral e celular em baço e intestino de camundongos isogênicos imunizados com taquizoítos irradiados por Cobalto 60. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade São Paulo; 2008.

Gallichan W, Rosenthal K. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. J Exp Med. 1996;184(5):1879–90.

Gavrilescu LC, Denkers EY. Interleukin-12 p40 and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 2003;71:2577-83.

Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A, Role of macrophage derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Top Immunol. 1996;219:127–39.

Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol. 1991 Jan;146(1):286-92.

Gigley JP, Fox BA, Bzik DJ.Long-term immunity to lethal acute or chronic type II *Toxoplasma gondii* infection is effectively induced in genetically susceptible C57BL/6 mice by immunization with an attenuated type I vaccine strain. Infect Immun. 2009 Dec;77(12):5380-8.

Goins CL, Chappell CP, Shashidharamurthy R, Selvaraj P, Jacob J. Immune complex-mediated enhancement of secondary antibody responses. J Immunol. 2010 Jun;184(11):6293-8.

Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie R, Cesbron-Delauw MF, Mercier C. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. Vaccine. 2007 May;25(21):4301-11.

Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. J Immunol. 2010 Sep;185(6):3117-25.

Grosh DS, Hoopywood LE. Biological effects of radiation. 2nd ed. New York: Academic Press; 1979

Gulinello M, Acquarone M, Kim JH, Spray DC, Barbosa HS, Sellers R, Tanowitz HB, Weiss LM. Acquired infection with *Toxoplasma gondii* in adult mice results in sensorimotor deficits but normal cognitive behavior despite widespread brain pathology. Microbes Infect. 2010 Jul;12(7):528-37.

Hedrick SM. Thymus lineage commitment: a single switch. Immunity. 2008 Mar;28(3):297-9.

Hiramoto RM., Galisteo Jr. AJ., Do Nascimento N, Andrade Jr. HF. 200Gy sterilized *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. Vaccine. 2002:20(16):2072-81.

Hoff EF, Carruthers VB Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? Trends Parasitol. 2002 Jun;18(6):251-5.

Hoffman SL, Doolan DL. Malaria vaccines-targeting Infected hepatocytes. Nat Med. 2000 Nov;6(11):1218-9.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4 þ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science. 1993;260:547–9.

Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Machado RZ, Navarro IT, Vidotto O, Vidotto MC, Garcia JL. *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. Exp Parasitol. 2008 Mar;118(3):386-92.

Israelski DM, Remington JS. Toxoplasmosis in patients with cancer. Clin Infect Dis. 1993 Nov;17(Suppl 2):S423-35.

Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. Scand J Immunol. 2000 Sep;52(3):240-8.

Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Förster-Wald E, Petersen E. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Mar;104(2):252-66.

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. 2008 Sep;26(41):5289-95.

Kalyuzhny AE. ELISPOT assay on membrane microplates. Methods Mol Biol. 2009;536:355-65.

Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. Int J Parasitol. 2004;34:401-9.

Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. Int J Parasitol. 2008 Oct;38(12):1359-70.

Kaul D, Ogra PL. Mucosal responses to parenteral and mucosal vaccines. Dev Biol Stand. 1998;95:141-6.

Langermans J, Van Der Hulst M, Nibbering P, Hiemstra P, Fransen P, Van Furth R. IFN-gamma induced L-arginine dependent *Toxoplasma*static activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor. J. Immunol. 1992;148(2):568-74.

Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity.Ann Ist Super Sanita. 2004;40(1):81-8

LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. Blood. 2008 Sep;112(5):1570-80.

Lee H, Ratajczak MZ. Innate immunity: a key player in the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2009 Jul-Aug; 57(4):269-78.

Leonard A, Rueff J, Gerber GB, Leonard ED. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. Radiat Prot Dosimetry. 2005;115(1-4):448-54.

Letscher-Bru V, Pfaff AW, bou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6615-9.

Lin YC, Chang MH, Ni YH, Hsu HY, Chen DS. Long-term immunogenicity and efficacy of universal hepatitis B virus vaccination in Taiwan. J Infect Dis. 2003 Jan;187(1):134-8.

Liu CH, Fan YT, Dias A, Esper L, Corn RA, Bafica A, Machado FS, Aliberti J. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice**.** J. Immunol. 2006;177:31-5.

Liu S, Shi L, Cheng YB, Fan GX, Ren HX, Yuan YK. Evaluation of protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of *Toxoplasma gondii* in mice. Parasitol Res. 2009 Jul;105(1):267-74.

Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. Cytometry. 1995 Nov;21(3):275-83.

Lu CY, Ni YH, Chiang BL, Chen PJ, Chang MH, Chang LY, Su IJ, Kuo HS, Huang LM, Chen DS, Lee CY. Humoral and cellular immune responses to a hepatitis B vaccine booster 15-18 years after neonatal immunization. J Infect Dis. 2008 May;197(10):1419-26.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis. 1992;15(2):2585-92.

Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, Bourland DD 3rd, Uttamchandani R, Fuhrer J, Jacobson J, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ ANRS 009 Study Team. N Engl J Med. 1993 Sep;329(14):995-1000.

Mack DG, McLeod R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory mmunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. J Clin Invest. 1992 Dec;90(6):2585-92.

Mackowiak M, Maki J, Motes-Kreimeyer L, Harbin T, Van Kampen K. Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology. Adv Vet Med. 1999;41:571-83.

Macnamara FN. Trans. Reactions following neurotropic yellow fever vaccine given by scarification in Nigeria. R Soc Trop Med Hyg. 1953 May;47(3):199-208.

Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, Faili A, Staib C, Garçon L, Hermine O, Beyne-Rauzy O, Fieschi C, Pers JO, Arakelyan N, Varet B, Sauvanet A, Berger A, Paye F, Andrieu JM, Michel M, Godeau B, Buffet P, Reynaud CA, Weill JC. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. Blood. 2008 May;111(9):4653-9.

Mantadakis E, Farmaki E, Buchanan GR. Thrombocytopenic purpura after measles-mumps-rubella vaccination: a systematic review of the literature and guidance for management. J Pediatr. 2010 Apr;156(4):623-8.

Manzi FR, Bóscolo FN, Almeida SM, Tuji FM. Morphological study of the radioprotective effect of vitamim E (dl-alpha-tocopheril) in tissue reparation in rats. Radiol. Bras. 2003;36(6):452-60.

Martínez-Gómez F, García-González LF, Mondragón-Flores R, Bautista-Garfias CR. Protection against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation in mice immunized with *Toxoplasma gondii* cytoskeleton proteins and Lactobacillus *casei* as adjuvant. Vet Parasitol. 2009 Mar;160(3-4):311-5.

Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow Fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded Doses of 17D vaccine. Appl Microbiol. 1973;25:538–44.

Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. J Infect Dis. 1993;167:577–83.

McGhee JR, Czerkinski C, Mestecky J. Mucosal vaccines: an overview. In: Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee JR, editors. Mucosal immunology. San Diego: Academic Press; 1999. p. 741–57.

McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. Annu Rev Immunol. 2005;23:487-513.

McHeyzer-Williams MG. B cells as effectors. Curr Opin Immunol. 2003 Jun;15(3):354-61.

McQuillan GM, Kruszon-Moran D, Kottiri BJ, Curtin LR, Lucas JW, Kington RS. Racial and ethnic differences in the seroprevalence of 6 infectious diseases in the United States: data from NHANES III, 1988-1994. Am J Public Health 2004;94:1952-8.

Mévélec MN, Ducournau C, Bassuny Ismael A, Olivier M, Sèche E, Lebrun M, Bout D, Dimier-Poisson I. Mic1-3 Knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against T.gondii-induced abortion in sheep. Vet Res. 2010 Jul-Aug;41(4):49.

Minor P. Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. Vaccine. 2009 May;27(20):2649-52.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004 Jun;363:1965-76.

Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. Exp Parasitol. 1999;92**:**87–99.

Mozzatto L, Procianoy RS. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003 May-Jun;45(3):147-51.

Mudd PA, Piaskowski SM, Neves PC, Rudersdorf R, Kolar HL, Eernisse CM, Weisgrau KL, de Santana MG, Wilson NA, Bonaldo MC, Galler R, Rakasz EG, Watkins DI. The live-attenuated yellow fever vaccine 17D induces broad and potent T cell responses against several viral proteins in Indian rhesus macaques--implications for recombinant vaccine design. Immunogenetics. 2010 Sep;62(9):593-600.

Nair N, Moss WJ, Scott S, Mugala N, Ndhlovu ZM, Lilo K, Ryon JJ, Monze M, Quinn TC, Cousens S, Cutts F, Griffin DE. HIV-1 infection in Zambian children impairs the development and avidity maturation of measles virus-specific immunoglobulin G after vaccination and infection. J Infect Dis. 2009 Oct;200(7):1031-8.

Nicole C, Manceaux L. Sur e infection a corps de Leishman (organisms voisings) du gondii. C. R. Hebd. Sceances Acad Sci. 1908;147:763-6.

Ogra PL, Karzon DT. Distribution of poliovirus antibody in serum, nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine. J Immunol. 1969;102:1423–30.

Oliveira EB Jr, Ferraz ML, Perez RM, Silva AE, Lanzoni VP, Granato CF. In vitro-induced antibody production in chronic hepatitis C virus infection. Braz J Med Biol Res. 2003 Mar;36(3):361-8.

Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 2006;24:497-518.

Pannuti CS, Morello RJ, Moraes JC, Curti SP, Afonso AM, Camargo MC, Souza VA. Identification of primary and secondary measles vaccine failures by measurement of immunoglobulin G avidity in measles cases during the 1997 São Paulo epidemic. Clin Diagn Lab Immunol. 2004 Jan;11(1):119-22.

Parker SJ, Roberts CW, Alexander J. CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. Clin Exp Immunol. 1991 May;84(2):207-12.

Parkins MD, McNeil SA, Laupland KB. Routine immunization of adults in Canada: Review of the epidemiology of vaccine-preventable diseases and current recommendations for primary prevention. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2009 Fall;20(3):81-90.

Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol. 2008 Apr;38(5):561-9.

Petersen E. Toxoplasmosis. Semin Fetal Neonatal Med. 2007 Jun;12(3):214-23.

Pettersen EK. Resistance to avirulent *Toxoplasma gondii* in normal and vaccinated rats. APMIS. 1988;96:820-4.

Pichichero ME. Booster vaccinations: can immunologic memory outpace disease pathogenesis? Pediatrics. 2009 Dec;124(6):633-41.

Pillai S, Cariappa A. The bone marrow perisinusoidal niche for recirculating B cells and the positive selection of bone marrow-derived B lymphocytes.Immunol Cell Biol. 2009 Jan;87(1):16-9.

Pinckney RD, Lindsay DS, Blagburn BL, Boosinger TR, McLaughlin SA, Dubey JP.Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1994 Jun;80(3):438-48.

Pinho JRR, Cardi BA, Andrade Jr HF, Barr PJ, Bathurst IC, Vicente EJ, Schenberg AC. Immunogenic properties of the *M. leprae* recombination 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. Int J Leprosy. 1995;63(3):381-90.

Plotkin SA. Immunologic correlates of protection induced by vaccination.Pediatr Infect Dis J. 2001 Jan;20(1):63-75.

Plotkin SA. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity Clin Infect Dis. 2008 Aug;47(3):401-9.

Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. Nature. 1996;381(6585):751–8.

Raymond J, Poissonnier M, Thulliez P, Forestier F, Daffos F, Lebon P. Presence of gamma interferon in human acute and congenital toxoplasmosis. J Infect Dis. 1990;150(6):961-2.

Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends Immunol. 2009 Jan;30(1):23-32.

Remington JS, Desmonts G. Congenital toxoplasmosis: variability in the IgM-fluorescent antibody response and some pitfalls in diagnosis. J Pediatr. 1973 Jul;83(1):27-30.

Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. J Infect Dis. 1995 Jun;171(6):1387-98.

Roghmann MC, Faulkner CT, Lefkowitz A, Patton S, Zimmerman J, Morris JG Jr. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. Am J Trop Med Hyg. 1999 May;60(5):790-2.

Roush SW, Murphy TV. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. JAMA. 2007 Nov;298(18):2155-63.

Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. The immune system in extreme longevity. Exp Gerontol. 2008 Feb;43(2):61-5.

Sayles PC, Gibson GW, Johnson LL. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 2000 Mar;68(3):1026-33.

Sedgwick JD. ELISPOT assay: a personal retrospective. Methods Mol Biol. 2005;302:3-14.

Sibley LD. Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2009 Jul 1;39(8):915-24.

Splendore A. Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesioni anatomiche d´une malattiache ricorda in moltopunti il Kalazar dell´uomo. Nota preliminaire pel. Rev Soc Sci São Paulo. 1908;3:109-12.

Steere AC, Sikand VK, Meurice F, et al. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outersurface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group [see comments]. N Engl J Med. 1998;339:209–15.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. Nat Rev Immunol. 2004 Mar;4(3):169-80.

Strugnell RA, Wijburg OL. The role of secretory antibodies in infection immunity. Nat Rev Microbiol. 2010 Sep;8(9):656-67.

Stübgen JP. Neuromuscular disorders associated with Hepatitis B vaccination. J Neurol Sci. 2010 May;292(1-2):1-4.

Sundermann CA, Estridge BH. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by cobalt-60 irradiation. J Parasitol. 2010 Apr;96(2):425-8.

Takashima Y, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Unno A, Kitoh K. Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii* reactivation in brain tissue. Int J Parasitol. 2008 Apr;38(5):601-7.

Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. Eur J Immunol. 2009 Aug;39(8):2065-75.

Taylor SM, Mallon TR, Green WP. Comparison of vaccination and ivermectin treatment in the prevention of bovine lungworm. Vet Rec. 1986;119(15):370-2.

Tuaillon E, Tabaa YA, Petitjean G, Huguet MF, Pajeaux G, Fondere JM, Ponseille B, Ducos J, Blanc P, Vendrell JP. Detection of memory B lymphocytes specific to hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) from HBsAg-vaccinated or HBV-immunized subjects by ELISPOT assay. J Immunol Methods. 2006 Aug;315(1-2):144-52.

Tumanov AV, Grivennikov SI, Kruglov AA, Shebzukhov YV, Koroleva EP, Piao Y, Cui CY, Kuprash DV, Nedospasov SA. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. Blood. 2010. In Press.

Turner GS. Immunoglobulin (IgG) and (IgM) antibody responses to rabies vaccine. J Gen Virol. 1978;40:595–604.

Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. Infect Immun. 2001 Feb;69(2):1151-9.

Upton AC. Radiation hormesis: data and interpretations. Crit Rev Toxicol. 2001 Jul;31(4-5):681-95.

Vesikari T, Sadzot-Delvaux C, Rentier B, Gershon A. Increasing coverage and efficiency of measles, mumps, and rubella vaccine and introducing universal varicella vaccination in Europe: a role for the combined vaccine. Pediatr Infect Dis J. 2007 Jul;26(7):632-8.

Villard O, Candolfi E, Despringre J, Derouin F, Marcellin L, Viville S, Kien T. Protective effect of low doses of an anti-IL-4 monoclonal antibody in a murine model of acute toxoplasmosis. Parasite Immunol. 1995;17:233-6.

Waldeland H, Frenkel JK. Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. J Parasitol. 1983 Feb;69(1):60-5.

Wales A, Kusel JR. Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action. Parasitol Today. 1992 Nov;8(11):358-63.

Wallace SS. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. Radiat Res. 1998 Nov;150(5 Suppl):S60-79.

Wastling IM, Harkins D, Buxton D. Western blot analysis of the IgG response of sheep vaccinated with S48 *Toxoplasma gondii* (Toxovax). Res Vet Sci 1994;57(3):384-6.

Webster JP, McConkey GA. *Toxoplasma gondii*-altered host behaviour: clues as to mechanism of action. Folia Parasitol (Praha). 2010 Jun;57(2):95-104.

Welton NJ, Ades AE. A model of toxoplasmosis incidence in the UK: evidence synthesis and consistency of evidence. JR Stat Soc Ser C Appl Stat. 2005;54:385-404.

West DJ, Calandra GB. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. Vaccine. 1996;14:1019–27.

Wijburg OL, Uren TK, Simpfendorfer K, Johansen FE, Brandtzaeg P, Strugnell RA.Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection. J Exp Med. 2006 Jan;203(1):21-6.

Williams DM, Grumet FC, Remington JS. Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 1978 Feb;19 (2):416-20.

Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. Immunol Rev. 2005 Aug;206:64-82.

Xue M, He S, Cui Y, Yao Y, Wang H. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. Par Intl. 2008;57:424-9.

Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, Gazzinelli RT, Belfort R Jr, Rizzo LV. Discrimination between patients with acquired

toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. J Infect Dis. 2000 Jun;181(6):2018-22.

Yap GS, Sher A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. Immunobiology. 1999;201:240-247.

Zou FC, Sun XT, Xie YJ, Li B, Zhao GH, Duan G, Zhu XQ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in southwestern China. Parasitol Int. 2009 Sep;58(3):306-7.