Nahiara Esteves Zorgi

ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E LINFÓCITOS B ESPLÊNICOS E DO SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM TAQUIZOÍTOS DE *Toxoplasma gondii* IRRADIADOS

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

São Paulo
2015

Nahiara Esteves Zorgi

ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E LINFÓCITOS B ESPLÊNICOS E DO SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM TAQUIZOÍTOS DE *Toxoplasma gondii* IRRADIADOS

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno - Hospedeiro

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

Versão original

São Paulo
2015

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.
Estudo das populações de linfócitos T e linfócitos B esplênicos e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados / Nahiara Esteves Zorgi. -- São Paulo, 2015.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de vacinas para Toxoplasmose.

Versão do título para o inglês: Study of populations T lymphocytes in the spleen and peripheral blood of immunized BALB/c mice with irradiated *T. gondii* tachyzoites.

1. *Toxoplasma gondii* 2. Vacina 3. Radiação ionizante 4. Linfócitos TCD4 5. Linfócitos TCD8 6. Linfócitos B I. Andrade Junior, Prof. Dr. 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/SBIB0168/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nahiara Esteves Zorgi.

Título da Tese: Estudo das populações de linfócitos T e linfócitos B esplênicos e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados.

Orientador(a): Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ……/……/……, considerou

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

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

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

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **100** nas fls. **107** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Heitor Franco de Andrade Junior**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Estudo da resposta imune especifica na mucosa intestinal em camundongos imunizados por diferentes vias com taquizoítos de Toxoplasma gondii irradiados"* do qual participam o(s) alunos **Nhiara Esteves Zorgi e os pesquisadores Nanci do Nascimento, Andrés Jimenez Galisteo Jr., Maria Natomi Sato,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.07.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 18 de julho de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

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 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 045.14

São Paulo, 24 de julho de 2014.

REF.: Protocolo nº 100/11.

"Estudo da resposta imune especifica na mucosa intestinal em camundongos imunizados por diferentes vias com taquizoítos de Toxoplasma gondii irradiados"

Prezado(a) Professor(a),

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 15.07.17.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilmo(a) Sr(a)
Prof.(a) Dr(a) Heitor Franco de Andrade Junior
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico esse trabalho, em especial a minha família, a qual amo muito, principalmente aos meus pais, Márcio Zorgi e Sandra Zorgi, e meu irmão Leonardo Zorgi, por toda força, incentivo, carinho e paciência durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dr. Heitor Franco de Andrade Jr**, por me mostrar o caminho da ciência, por acreditar em mim, pelo apoio e incentivo durante a realização do trabalho e principalmente por contribuir para o meu crescimento profissional.

Ao **Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr,** pela amizade e confiança no meu trabalho e a disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho.

À **Drª. Maria Notomi Sato,** pela colaboração no trabalho com a parte da citometria de fluxo, gostaria de agradecer as sugestões fornecidas para a realização dos experimentos.

Ao **Luciano Monteiro da Silva,** por todo esforço, paciência e dedicação para a realização dos trabalhos do laboratório de protozoologia com a compra e fornecimento de reagentes.

À **Andréa Costa**, **Jaqueline Polizeli Rodrigues e Camila Aparecida de Carvalho**, pelo apoio, companheirismo, amizade, carinho e principalmente por fazer parte dos momentos bons e ruins sempre me ajudando e incentivando.

Á **Roselaine Pereira Alvim Cardoso,** pelos ensinamentos técnicos, pela produção de antígenos e principalmente pela amizade e momentos de boas conversas.

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

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia do IMTSP: **Bárbara Fialho Carvalho, Bruna Macedo, Luciana Regina Meireles, Thiago Fidelis Ferrão, Michel Rodrigues Ferreira Grillo, Raissa Char Forgoso, Nathaly Montagnana de Menezes, Joana Gabriela Desiderato, Silvia Elaine Castelam, Juliana Nunes Mecca, Marina Cortez Demicheli, Vanessa Rodrigues da Silva, Flávia**

Freitas, Fernanda Siqueira Cavalcante, Talita Caroline Coelho dos Santos, Giselle Pacifico Sartori, Tamires Chorense Nunes, Elizama Carneiro Machado Bezerra, Cynara Marques de Almeida, Renan Tripode Bartaquini, pela amizade, apoio e carinho.

Á **Silvia Cristina Leopoldino** e a **Karen Cristine Pavan Rocha** por organizar, limpar e manter melhores condições de trabalho no laboratório de protozoologia.

Ao laboratório de imunologia do Instituto do Coração, principalmente a **Drª. Janaina Baptista Alves** pelos ensinamentos de técnicas de citometria de fluxo e por disponibilizar o uso do citômetro de fluxo.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN), principalmente a **Engª. Elizabeth S. R. Somessari, Eng. Carlos G. da Silveira e Drª. Nanci do Nascimento**, pelo apoio na radiação dos parasitas.

À **Noemia Mie Orii,** pelos ensinamentos e pela ajuda indispensável na citometria de fluxo e principalmente pela amizade.

À **Drª. Paula Ordonhez Rigato,** pelas sugestões no trabalho e principalmente pelos ensinamentos e ajuda na realização da citometria de fluxo.

A **Luanda Mara da Silva Oliveira**, pelos ensinamentos técnicos e principalmente pela ajuda e dicas fornecidas para realizar o CBA.

Aos amigos do laboratório de dermatologia do LIM 56 do IMTSP: **Luana de Mendonça Oliveira, Dr. Cyro Alves Brito e Tiago Titzz,** pelo apoio, ajuda, aprendizado e principalmente pelo fornecimento de reagentes necessários para a realização dos experimentos.

À **Dr.ª Thaís Alves da Costa Silva,** pela amizade e pelos momentos de boas conversas.

À **Drª. Maria Regina D'Imperio Lima, Dr. Renato Barboza e Drª. Solange Barros Carbonare**, pelas sugestões para melhorar o trabalho que foi realizado na qualificação.

À **Drª. Cynthia Baldwin** da Universidade de Massachusetts Amherst, pela oportunidade de conhecer o laboratório, pelo aprendizado e principalmente por me proporcionar um crescimento profissional.

Aos amigos do laboratório *Integrated Sciences Building* da Universidade de Massachusetts Amherst, **Payal Yokota, Alie Gillespie e Anna Ye**, pelo apoio, companhia e ajuda indispensável durante os dias que passei na cidade e principalmente pela amizade.

Aos amigos do **Centro Educacional Taboão,** pela amizade, apoio e principalmente pelo incentivo.

Às amigas **Eliane D'Aprile, Marina França, Alessandra Bannitz, Mônica Martins Zanuto, Lilian Dombi e Graziela Assis**, pelo apoio, força e principalmente pela amizade e momentos de desabafo.

À minha família **Márcio Zorgi, Sandra Regina Esteves Zorgi, Michele Esteves Zorgi, Leonardo Esteves Zorgi, Gustavo Zorgi Martinez, Júlia Zorgi Martinez e Lucas Zorgi Martinez**, pela força, dedicação, incentivo, carinho e principalmente pelo amor, a qual não vivo sem.

Ao meu namorado, **Fábio Leoncio Recacho,** pelo amor e carinho.

Ao **José Marques Recacho, Ermínia Leoncio Marques Recacho e Érika Cristina Marques Recacho**, pela torcida e carinho.

À **família Ungri**, pela torcida, apoio, incentivo e principalmente pelo amor e carinho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)**, pelo apoio financeiro.

Á **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Laboratório de Investigação Médica - 49 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (LIM-49 HCFMUSP)** pelo suporte técnico e na compra de materiais, equipamentos e reagentes necessários para a realização desse projeto.

À **Deus**, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

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

Á todos muito obrigado!!!

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito, por que vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitoria, nem derrota."

(Theodore Roosevelt).

RESUMO

Zorgi NE. Estudo das populações de linfócitos T e linfócitos B esplênicos e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiados. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo; 2015.

A infecção por *Toxoplasma gondii* induz uma forte resposta imune e duradoura, capaz de prevenir a maioria das reinfecções, mas permitindo cistos teciduais. Taquizoítos de *T. gondii* esterelizados por radiação ionizante é uma vacina interessante para induzir uma imunidade semelhante à infecção, mas sem a formação de cistos. Neste estudo avaliamos as populações celulares do sangue e do baço induzidas pela imunização, a resposta imune humoral, celular e a proteção após desafio com parasitas viáveis. Camundongos BALB/c foram imunizados com três doses com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via oral (v.o.) ou intraperitoneal (i.p.). Os animais foram desafiados com 10 cistos da cepa ME-49 ou VEG por via oral 90 dias após a última dose, e os camundongos imunizados apresentaram altos níveis de proteção com baixa carga parasitária. Camundongos imunizados por i.p. apresentaram níveis mais elevados de anticorpos específicos de IgG, IgA e IgM no soro, e esses animais também apresentaram maiores níveis de anticorpos específicos IgG e IgM de alta afinidade. Camundongos imunizados por v.o. apresentaram maiores níveis de anticorpos específicos IgA de alta afinidade no soro. As populações de células B ($CD19^+$), plasmócitos ($CD138^+$), células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ aumentaram tanto no sangue como no baço dos animais imunizados. As células esplênicas de camundongos imunizados por i.p. também mostraram a produção induzida por antígeno especifico de IL-10, IFN-γ e IL-4. Células $TCD4^+$ e células B e provavelmente células $TCD8^+$ do baço de camundongos imunizados por i.p. proliferaram após a estimulação com antígeno específico. A proteção correlacionada com as células $TCD8^+$ do baço e do sangue, com anticorpos IgG, IgM e IgA de alta afinidade e com a produção de IL-10 e IL-4 por células esplênicas. A imunização com esse modelo vacinal induziu uma resposta imune mediada com células B, $TCD4^+$ e $TCD8^+$, com aumento da resposta imune humoral e celular que são necessárias para proteção do hospedeiro após uma infecção. Essa resposta imune induzida por taquizoítos de *T. gondii* irradiados é uma resposta semelhante a uma infecção natural, sendo assim o desenvolvimento de vacinas utilizando a radiação ionizante como uma ferramenta, pode ser um modelo atrativo e eficiente para testar novos imunógenos no futuro.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Vacina. Radiação ionizante. Linfócitos T $CD4^+$. Linfócitos T $CD8^+$. Linfócitos B.

ABSTRACT

Zorgi NE. Study of populations T lymphocytes and B lymphocytes in the spleen and peripheral blood of immunized BALB/c mice with irradiated *T. gondii* tachyzoites. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo; 2015.

Infection with *Toxoplasma gondii* induces a strong and long lasting immune response, capable to prevent most reinfections but allowing tissue cysts. Irradiated sterilized *T.gondii* tachyzoites is an interesting vaccine to induce immunity similar to infection but without cysts. In this study we evaluated the cellular immune response in blood and spleen of mice immunized with this preparation by mouth(v.o.) or intraperitoneal (i.p), looking for the protection after challenge with viable parasites. BALB/c mice were immunized with three i.p. or v.o. doses of *T. gondii* irradiated tachyzoites. Challenge with 10 cysts of the ME-49 or VEG strain orally 90 days after the last dose resulted in high levels of protection with low parasite burden in immunized animals. There are higher levels of specific IgG, IgA and IgM antibodies in serum, with i.p. immunized mice with high levels of IgG and IgM high affinity antibodies than orally immunized mice which had more high affinity IgA. B cells ($CD19^+$), plasma cells ($CD138^+$), $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell population increased both in blood and spleen. Cells from spleen of i.p. immunized mice also show antigen induced production of IL-10, IFN-γ and IL-4. Spleen $CD4^+$, B cells and probably CD8+ cells from i.p. immunized mice proliferated with specific antigen. Protection correlated with spleen and blood CD8 T cells, high affinity IgG and IgM and antigen induced IL-10 and IL-4 production. Immunization with irradiated tachyzoites of *T. gondii* induces an immune response mediated by B cells, CD4 and CD8 with increased humoral and cellular immune response that are necessary for host protection after infection. Similar to natural infection but free of tissue cysts, this immunity restrain infection at challenge and can be an attractive and efficient model for vaccine development in toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii.* Vaccine. $CD4^+$ T lymphocytes. $CD8^+$ T lymphocytes. B-lymphocytes. Ionizing radiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*..... 31

Figura 2: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*..... 34

Figura 3: Diferentes vias de transmissão do *Toxoplasma gondii* nos hospedeiros definitivos e intermediários..... 35

Figura 4: Estratégia de análise para linfócitos T *helper* do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle..... 55

Figura 5: Estratégia de análise para linfócitos T citotóxicos do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle..... 56

Figura 6: Estratégia de análise para linfócitos B do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle..... 57

Figura 7: Estratégia de análise para plasmócitos do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle..... 58

Figura 8: Estratégia da análise da proliferação de células T CD4 ($CD3^+CD4^+$) do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle..... 60

Figura 9: Estratégia da análise da proliferação de células T CD8 ($CD3^+CD8^+$) do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle..... 61

Figura 10: Estratégia da análise da proliferação de células B ($CD19^+$) do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle..... 62

Figura 11: Quantificação absoluta de parasitas de *Toxplasma gondii* por *real time* PCR, em tecido cerebral de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto60 por via i.p. ou v.o. desafiados com 10 cistos da cepa ME-49 (A) ou cepa VEG (B) por v.o..... 65

Figura 12: Detecção de anticorpos IgG total anti-*T.gondii* (círculos abertos) e anticorpos IgG de alta avidez anti-*T.gondii* (círculos fechados) em soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 45 dias e 120 dias (B) da imunização..... 68

Figura 13: Detecção de anticorpos IgA total anti-*T.gondii* (círculos abertos) e anticorpos IgA de alta avidez anti-*T.gondii* (círculos fechados) em soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 45 dias da imunização..... 70

Figura 14: Detecção de anticorpos IgM total anti-*T.gondii* (círculos abertos) e anticorpos IgM de alta avidez anti-*T.gondii* (círculos fechados) em soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 15 dias da imunização..... 71

Figura 15: Proporção (%) de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 74

Figura 16: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 75
Figura 17: Número absoluto de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto60 por via i.p. ou v.o..... 76
Figura 18: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) esplênicos de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 78
Figura 19: Proporção de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 79
Figura 20: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 80
Figura 21: Número absoluto de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto60 por via i.p. ou v.o..... 81
Figura 22: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) esplênicos de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 83
Figura 23: Proporção de linfócitos B ($CD19^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 84
Figura 24: MFI FITC/CD23 (A); PE/CD69 (B) da população de linfócitos B ($CD19^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 85

Figura 25: Número absoluto de linfócitos B – $CD19^+$ de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 86

Figura 26: MFI FITC/CD23 (A); PE/CD69 (B) da população de linfócitos B ($CD19^+$) esplênicos de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 87

Figura 27: Proporção de plasmócitos ($CD138^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 88

Figura 28: Número absoluto de plasmócitos ($CD138^+$) de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o..... 89

Figura 29: Proliferação celular de células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 15 dias da imunização..... 91

Figura 30: Produção de IL-10 (A), **p**rodução de IL-17-A (B), produção de TNF-alfa (C), produção de IFN-gama (D), produção de IL-6 (E), produção de IL-4 (F) e produção de IL-2 (G) por células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., estimuladas com extrato solúvel de *T. gondii* após 15 dias da imunização..... 93

Figura 31: Esquema da resposta imune induzida por taquizoítos de *T. gondii* irradiados por diferentes vias de administração. Na imunização por via intraperitoneal observamos um aumento de células B, células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ no baço e não no sangue periférico. A resposta imune humoral induzida mostrou um aumento de anticorpos IgG no soro. A resposta celular nas células esplênicas mostrou um aumento da produção de IFN-γ, IL-4 e IL-10. Na imunização por via oral observamos o aumento de células B, células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ no sangue periférico e não no baço. A resposta imune humoral induzida mostrou um aumento de anticorpos IgA no soro. A resposta celular nas células esplênicas foi ausente ou similar aos animais

controles..... 104

Figura 32: Esquema da proteção induzida por imunização por via intraperitoneal e por via oral com taquizoítos de *T. gondii* irradiados. Nota-se que as células TCD8^{+} e a resposta imune humoral induzida favorecem a proteção. Na imunização por via intraperitoneal a resposta imune induzida diminuiu a carga parasitária no cérebro, já a imunização por via oral os animais apresentaram uma carga parasitária maior no cérebro..... 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de primers (B1 do *Toxoplasma gondii*) utilizado no real time PCR..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

($Al(OH)_3$) - hidróxido de alumínio

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida).

AMA - Apical Membrane Antigen (Antígeno de membrana apical)

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

Células NK – Células *natural Killer*

CFSE - Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

CO_2 – Gás Carbônico

ConA - Concanavalin A

DMSO – dimetilsulfóxido.

e^-_{aq} – elétron aquoso

ELISA – Enzyme Linked immunosorbent Assay

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

$H^\bullet$ - Átomo de Hidrogênio

H_2 – Hidrogênio molecular

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4 - Ácido Sulfúrico

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

$HO_2^\bullet$ - Peroxila

i.p. - imunização intraperitoneal.

IEL – Intraepithelial Lymphocytes (Linfócitos intraepiteliais)

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-17 - Interleukin 17 (Interleucina 17)

IL-2 – Interleukin 2 (Interleucina 2)

IL-4 - Interleukin 4 (Interleucina 4)

IL-5 - Interleukin 5 (Interleucina 5)

IL-6 - Interleukin 6 (Interleucina 6)

MFI – Mean Fluorescence Intensity (média da intensidade de fluorescência)

MHCI – Major Histocompatibility Complex class I (*C*omplexo Principal de Histocompatibilidade classe I)

MHCII – Major Histocompatibility Complex class II (*C*omplexo Principal de Histocompatibilidade classe II)

MICs – Microneme Proteins (proteína de micronemas)

NaCl – Cloreto de sódio

OH•- Hidroxila

PBS – Phosphate buffered saline (Salina Tamponada com Fosfato)

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

PCR- Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

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

ROPs –Rhoptrys Proteins (proteínas de roptrias)

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SAGs – Surface antigens (antígenos de superfície)

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)

TLR – Toll like Receptor

TMB – Tetramethylbenzidine

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

V.O. – imunização por via oral.

V/V – (volume/volume).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 26
2 OBJETIVOS..... 29
2.1 Gerais..... 29
2.2 Específicos..... 29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA...... 30
3.1 *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose..... 30
3.1.1 Ciclo de vida do Toxoplasma gondii..... 32
3.1.2 Transmissão da Toxoplasmose..... 34
3.1.3 Toxoplasmose em imunocompetentes..... 35
3.1.4 Toxoplasmose em imunocomprometidos..... 36
3.1.5 Toxoplasmose congênita..... 37
3.1.6 Toxoplasmose em animais de consumo..... 38
3.2 Resposta imunológica na Toxoplasmose..... 39
3.3 Vacinas para a Toxoplasmose..... 42
3.4 Radiação ionizante como ferramenta para produção de vacinas..... 45
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 48
4.1 Parasitas e animais experimentais..... 48
4.2 Obtenção de antígenos extrato total de *T. gondii*..... 49
4.3 Irradiação dos taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*..... 49
4.4 Imunização dos camundongos BALB/c..... 50
4.5 Desafio e extração de DNA do tecido cerebral de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral, com diferentes cepas cistogênicas de *T. gondii*..... 50
4.6 Análise por Real time PCR da quantificação absoluta de parasitas em tecido cerebral de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral, desafiados com diferentes cepas cistogênicas de *T. gondii*..... 51
4.6.1 Confecção dos Primers..... 51
4.7 ELISA para a detecção de anticorpos totais e de alta afinidade IgG,

IgM e IgA específicos no soro dos camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal ou por via oral com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60..... 52
4.8 Marcação de superfície de células esplênicas e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto de 60 por via intraperitoneal e por via oral..... 53
4.9 Estratégia de análise para determinar as populações celulares esplênicas e do sangue periférico de camundongos imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal ou por via oral..... 54
4.10 Proliferação celular de linfócitos TCD4 ($CD3^+CD4^+$), linfócitos TCD8 ($CD3^+CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) no baço de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral..... 58
4.11 Estratégia de análise para determinar a proliferação celular de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) do baço de camundongos imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal ou por via oral..... 59
4.12 Produção de citocinas IFN-γ, IL-10, IL-2, IL-4, IL6, IL-17A e TNF-α por células esplênicas e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral..... 62
4.13 Análise estatística..... 63
5 RESULTADOS..... 64
5.1 Proteção imunológica dos camundongos BALB/c imunizados por v.o. e por via i.p. com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados a 255Gy de Cobalto 60, após desafio com diferentes cepas cistogênicas.. 64
5.2 Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c imunizados por via i.p. e por v.o. com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60..... 66
5.2.1 Anticorpos IgG total e IgG de alta afinidade anti-T. gondii..... 66

5.2.2 Anticorpos IgA total e IgA de alta afinidade anti-T. gondii..... 69
5.2.3 Anticorpos IgM total e IgM de alta afinidade anti-T. gondii..... 70
5.3 Perfil imunológico dos camundongos BALB/c imunizados por via i.p. e por v.o. com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60..... 72
5.3.1 Proporção e ativação celular de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) no sangue..... 73
5.3.2 Número absoluto e ativação celular de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) no baço..... 76
5.3.3 Proporção e ativação celular de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) no sangue..... 79
5.3.4 Número absoluto e ativação celular de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) no baço..... 81
5.3.5 Proporção e ativação celular de linfócitos B ($CD19^+$) do sangue periférico..... 84
5.3.6 Número absoluto e ativação celular de linfócitos B ($CD19^+$) do baço..... 85
5.3.7 Proporção de plasmócitos ($CD138^+$) do sangue periférico..... 88
5.3.8 Número absoluto de plasmócitos ($CD138^+$) do baço..... 88
5.4 Células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados por v.o. e por via i.p. com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados a 255Gy de Cobalto 60 responsivas ao antígeno..... 90
5.4.1 Proliferação celular de células B, $TCD4^+$ e $TCD8^+$ por ensaio de CFSE..... 90
5.4.2 Produção de citocinas por células esplênicas por ensaio de CBA..... 91
6 DISCUSSÃO..... 95
7 CONCLUSÃO..... 107
7.1 Gerais..... 107
7.2 Específicas..... 107
REFERÊNCIAS..... 109
APÊNDICE A - Correlação quantitativa preliminar entre eventos imunológicos e o grau de proteção obtido nos experimentos de desafio. Correlação de Spearman estimada para significância duplo-caudal do

modelo..... 124
APÊNDICE B - Produção de IL-10 (A), produção de IL-17-A (B), produção de TNF-alfa (C), produção de IFN-gama (D), produção de IL-6 (E), produção de IL-4 (F) e produção de IL-2 (G) por células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., estimuladas com estímulo inespecífico (ConA) após 15 dias da imunização..... 125
APÊNDICE C - Produção de IL-10 (A), produção de IL-17-A (B), produção de TNF-alfa (C), produção de IFN-gama (D), produção de IL-6 (E), produção de IL-4 (F) e produção de IL-2 (G) por células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., sem estímulo (Basal) após 15 dias da imunização..... 127

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença de grande importância médica e veterinária causada por um protozoário intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii* (Dubey, 2008). A infecção por esse agente pode ocorrer por diversas vias como: transmissão congênita (Torgerson, Mastroiacovo 2013), consumo de carnes malpassadas ou crua contendo cistos do parasita (Hotop et al., 2014; Vitale et al., 2014), ingestão de alimentos (Smith, 2013) ou água contaminados com oocistos (de Moura et al., 2006), ou ainda por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos de uma pessoa infectada (Dubey, Jones, 2008). Animais de consumo como bovinos, suínos, ovinos e caprinos são suscetíveis à infecção, o que favorece a contaminação de sua carne com cistos teciduais de *T. gondii* e tornam-se uma importante fonte de transmissão da doença para os humanos (Jones, Dubey 2012). Nesses animais de consumo, a toxoplasmose pode causar abortos, levando a perdas econômicas consideráveis para a indústria pecuária, além do que, a infecção com *T. gondii* em ovinos e caprinos é uma das principais causas de perdas reprodutivas na sua pecuária (Innes et al., 2011).

A infecção pelo *T. gondii* induz no hospedeiro uma proteção imunológica forte e duradoura contra reinfecções (Dupont et al., 2012). Na infecção aguda, as formas infectantes, esporozoítos de oocistos ou bradizoítos de cistos teciduais, se diferenciam em taquizoítos, uma forma de rápida proliferação com disseminação sistêmica em todos os tecidos. A doença aguda é geralmente controlada pela resposta imune específica, porém, não suficiente para a eliminação do agente. Ao contrário disso, há um equilíbrio onde o parasita sobrevive no hospedeiro na forma de bradizoítos (cistos teciduais) que podem permanecer por toda a vida do hospedeiro em muitos órgãos, principalmente no sistema nervoso central, músculo estriado esquelético, liso e cardíaco (Dubey, 2008).

Em indivíduos imunocompetentes a doença geralmente é assintomática, mas a infecção por *T. gondii* pode atingir a região ocular levando até mesmo a perda de visão em fração significante dos infectados (Escoffier et al., 2010). Toxoplasmose congênita transmitida durante a infecção aguda da mãe para o feto pode levar a lesão neurológica permanente com ou sem hidrocefalia, microcefalia ou coriorretinite com cegueira (Torgerson, Mastroiacovo 2013). A toxoplasmose causa doença mais

grave e letal principalmente em indivíduos com o sistema imune deficiente, como portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Luma et al., 2013), pacientes transplantados (Derouin, Pelloux, 2008) ou com neoplasias (Abedalthagafi et al., 2009; Alvarado-Esquivel et al., 2010).

Atualmente, não existe nenhuma vacina eficiente para a prevenção completa da toxoplasmose em seres humanos ou animais, existe apenas uma vacina comercial para a toxoplasmose, a TOXOVAX® (Schering-Plough, Walton, Greater London, Inglaterra). Esta vacina é utilizada na Nova Zelândia para a imunização de ovelhas, e utiliza taquizoítos vivos da cepa S48 “incompleta” de baixa capacidade de formação de cistos teciduais. A imunização resulta na prevenção de 70% dos abortos, reduzindo as perdas econômicas na produção de lã (Buxton, 1993). Entretanto, a vacina apresenta dificuldades logísticas na distribuição das doses para outros países devido à baixa estabilidade e formulação para rebanhos (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2014).

Existem vários estudos que avaliam novas vacinas para toxoplasmose, incluindo vacinas inativadas (Mevelec et al., 2010), proteínas recombinantes (Liu et al., 2010), DNA ou plasmídeos (Parthasarathy et al., 2013), atenuação por ultravioleta (Zhao et al., 2013) ou atenuação por radiação gama (Hiramoto et al., 2000; Zorgi et al., 2011). Estes modelos vacinais foram testados em modelos animais de forma geralmente simplificada, mas nenhum foi amplamente testado para resposta imune celular ou células de memória de longa duração no hospedeiro.

Muitos desafios permanecem no desenvolvimento de vacinas, em grande parte devido à natureza do agente patogênico (Zak, Aderem, 2015). A maioria das vacinas licenciadas para uso humano foram estudadas assumindo que a imunidade humoral é a chave mediadora da eficiência, mas provavelmente a imunidade celular também seja fundamental para aumentar os níveis de proteção, principalmente para patógenos intracelulares eucariotos (De Rosa, 2012). A resposta imune induzida por sinais de células $TCD4^+$ ou $TCD8^+$ específicas para um determinado patógeno são descritos para algumas vacinas, como a malária (Teo et al., 2012). Para toxoplasmose a resposta imune mediada por células $TCD4^+$, células $TCD8^+$ e células B pode cooperar para aumentar a proteção do hospedeiro, portanto, esta resposta específica ao agente proporciona uma imunidade eficiente a longo prazo (Munoz et al., 2011).

A construção de um modelo vacinal profilático eficaz para a toxoplasmose deve induzir uma resposta imune efetora mediada tanto por células $TCD4^+$ como células B, que induzem resposta imune humoral específica com produção de anticorpos (Dupont et al., 2012), e a resposta efetora de células $TCD8^+$ contribui para o controle de células infectadas (Gazzinelli et al., 1992). Esta situação complexa implica que para agentes patogênicos intracelulares a imunidade deve ter ambas as respostas, tanto anticorpos, para evitar a invasão inicial, como células $TCD8^+$ de memória, para a eliminação de células infectadas (Grover et al., 2014).

Neste trabalho nós estudamos um modelo vacinal para a toxoplasmose utilizando a radiação ionizante para atenuar os taquizoítos de *T. gondii.* Os parasitas irradiados não apresentam alterações biológicas ou morfológicas, porém esses parasitas não conseguem se multiplicar no interior das células hospedeiras, e a indução de uma resposta imune específica similar a uma infecção natural (Hiramoto et al., 2000). Neste modelo vacinal nós analisamos as populações de linfócitos T e B do baço e do sangue periférico, resposta imune humoral e a produção de citocinas induzidas pela imunização por via oral e por via intraperitoneal. E também analisamos, após a imunização, a proteção imunológica duradora por meio do desafio utilizando cepas viáveis de diferentes genótipos.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- ✓ Avaliar as vias imunológicas utilizadas, ativação de linfócitos T e B, indução da resposta imune humoral e celular responsáveis pela proteção após a imunização com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* esterilizados por radiação ionizante.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar a proteção imunológica induzida por taquizoítos de *T. gondii* irradiados em camundongos imunizados por via i.p. ou por v.o. e desafiados com cepas cistogênicas de diferentes genótipos do agente*;*

- ✓ Avaliar a resposta humoral específica induzida por taquizoítos de *T. gondii* irradiados em camundongos imunizados por via i.p. ou por v.o.; tanto quanto as classes de imunoglobulinas ou a sua avidez pelo antígeno.

- ✓ Analisar o perfil imunológico e sua ativação no baço e no sangue periférico de camundongos imunizados por via i.p. ou por v.o. com taquizoítos de *T. gondii* irradiados.

- ✓ Avaliar as células responsivas ao antígeno no baço de camundongos imunizados por via i.p. ou por v.o. com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por meio da resposta imune celular e da proliferação celular após desafios com antígeno.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose. Trata-se de um parasita intracelular obrigatório que afeta 30% da população mundial (Montoya, Liesenfeld, 2004). Esse protozoário foi descoberto em 1908, independentemente por Splendore em isolados de coelhos, no Brasil, e por Nicolle e Manceaux (1908) em células do baço e do fígado de um roedor, o *Ctenodactylus gundi,* no norte da África. *T. gondii* é considerado um dos patógenos mais bem-sucedidos do mundo. Vários fatores contribuem para este sucesso, incluindo um complexo ciclo de vida, em que o parasita pode ser transmitido por meios verticais e horizontais, a propagação eficiente tanto nos hospedeiros definitivos (felinos) como nos hospedeiros intermediários (animais homeotermos) e mecanismos abrangentes para evitar ou desarmar a imunidade do hospedeiro (Dubey et al., 1998). Além disso, o *T. gondii* desenvolveu um meio de se replicar eficientemente dentro do ambiente hostil intracelular da sua célula hospedeira, com capacidade de formar cistos e evoluir para uma infecção crônica nos seus hospedeiros intermediários por longo tempo ou até mesmo por toda vida (Kim, Weiss, 2004).

O *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa, um filo que é representado por uma diversidade de protozoários patogênicos que se caracterizam por possuírem uma estrutura chamada complexo apical, e diversas organelas características do filo, como anéis polares, conóide, róptrias, micronemas e o apicoplasto. Essas estruturas juntamente com a secreção de uma diversidade de proteínas das organelas específicas são responsáveis pelo processo de invasão celular na célula hospedeira. Esses protozoários também apresentam estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Dubey et al., 1998) (figura 1).

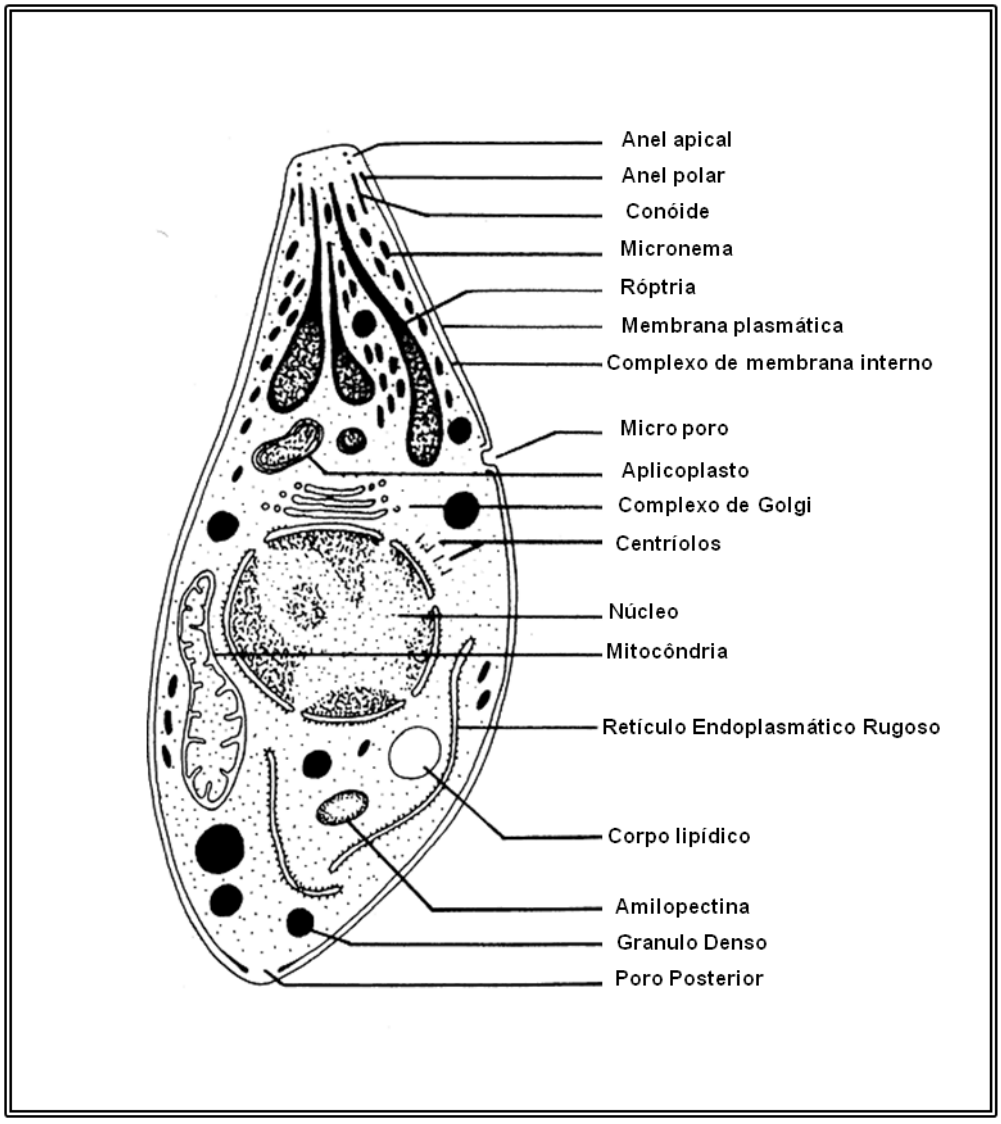


Figura 1: Representação esquemática do taquizoíto de *Toxoplasma gondii.* Imagem modificada a partir de Dubey et al., 1998.

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita que afeta uma variedade de animais homeotérmicos. Sua patologia depende de fatores como a susceptibilidade do hospedeiro e a virulência da cepa infectante (Calero-Bernal et al., 2013). A toxoplasmose é de grande importância tanto médica como veterinária, e geralmente é uma doença benigna, mas ocasionalmente está associada a abortos ou malformações fetais tanto em humanos como em animais (Dubey et al., 2004). Além disso, a toxoplasmose ganhou importância devido à encefalite causada pelo *T. gondii* em pacientes com AIDS (Adurthi et al., 2010). O tratamento desta doença é difícil devido a efeitos tóxicos dos medicamentos disponíveis, e do risco de reinfecção, que pode ocorrer rapidamente (Bhopale, 2003).

As taxas mais altas de infecção por *T. gondii* ocorrem nos trópicos, devido a maior temperatura e umidade, o que favorece a maturação de oocistos no solo, e a presença do hospedeiro definitivo, os felinos, também é considerado um fator importante para o aumento da infecção (Dubey, 2009). As taxas de prevalência variam muito entre os países (de 10% a 80%), e muitas vezes dentro de um país ou entre diferentes comunidades da mesma região. Soroprevalências baixas (10% a 30%) foram observados na América do Norte, no Sudeste Asiático e no Norte da Europa. Prevalências moderadas (30% a 50%) têm sido encontradas em países da Europa Central e Sul da Europa, e prevalências altas foram encontradas na América Latina e nos países africanos tropicais (Robert-Gangneux, Dardé, 2012).

A infecção humana tem sido relacionada com a ingestão de carne crua ou mal-cozida contendo cistos teciduais de *T. gondii* (Jones, Dubey, 2012). Entretanto, água contaminada com oocistos também tem sido considerada uma importante fonte de transmissão da infecção (Bahia-Oliveira et al., 2003). Isso foi demonstrado por estudos epidemiológicos em áreas endêmicas, em que a ingestão de água não filtrada ou não fervida é considerada um importante fator de risco para soropositividade de *T. gondii* (Jones, Dubey, 2010). Mamíferos aquáticos (como golfinhos, lontras marinhas, peixes-boi ou leões-marinhos) também são frequentemente infectados com *T. gondii* em muitas áreas, reforçando que a água contaminada pode de fato ser uma importante fonte de contaminação (Gibson et al., 2011; Santos et al., 2011).

3.1.1 Ciclo de vida do Toxoplasma gondii

O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo e heteroxênico constituído por uma fase assexuada e uma fase sexuada. A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários, que são praticamente todos os animais de sangue quente, incluindo o homem, e a fase sexuada ocorre somente nos felídeos, tanto domésticos como selvagens (Dubey et al., 1998) (Figura 2).

Os felídeos podem ser contaminados por meio da ingestão de cistos presentes nos tecidos (presas infectadas), por oocistos presentes no ambiente, ou ainda com água contaminada (Afonso et al., 2006). A parede do cisto ou do oocisto é rompida, no estômago, por enzimas gástricas, liberando os bradizoítos (cistos) ou

esporozoítos (oocistos) e infectando os enterócitos, onde ocorrem várias multiplicações por esquizogonia, gerando merozoitos que reinvadem os enterócitos (Dubey et al., 1998). Este primeiro passo é seguido pelo desenvolvimento sexuado, ocorrendo a gametogonia, com a formação de gâmetas masculinos e femininos no interior dos enterócitos (Robert-Gangneux, Dardé, 2012). Os gametócitos masculinos liberam gametas biflagelados que procuram os macrogametócitos femininos para a fecundação. Após a fecundação, são formados os oocistos dentro dos enterócitos, essas formas são liberadas pelo rompimento da célula e excretados para o ambiente como oocistos não-esporulados juntamente com as fezes do hospedeiro (Dubey et al., 1998). O processo de esporogonia ocorre depois de alguns dias no meio externo, o oocisto esporulado apresenta dois esporocistos e cada um contendo quatro esporozoítos haplóides. Os oocistos são resistentes às condições ambientais por vários meses, e podem infectar uma variedade de hospedeiros por meio de contaminação extrínseca de alimentos crus ou da água (Robert-Gangneux, Dardé, 2012).

Após a ingestão de oocistos por um hospedeiro intermediário, ocorre a degradação da parede do oocisto no estômago por enzimas gástricas com a liberação de esporozoítos que penetram nas células intestinais e em outros tipos celulares, em que o parasita se multiplica rapidamente da forma assexuada, como taquizoítos por um processo de endodiogenia. Nessa fase, ocorre disseminação por todo organismo, em qualquer hospedeiro, e em consequência, a formação de uma intensa resposta imunológica, que resulta na emissão de sinais que induz sua transformação em bradizoítos com formação de cistos teciduais no interior das células (Esch, Petersen, 2013). Geralmente, o parasita mantém por toda a vida da célula, o que é mais visto em células estáveis, como células musculares ou neurônios (Dubey et al., 1998).

Após a ingestão de cistos teciduais pelo hospedeiro intermediário por meio de carne crua ou mal-cozida, ocorre o rompimento do cisto no estômago, causando a liberação de bradizoítos, sendo que estes irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro, novamente fase de divisão rápida, os taquizoítos, levando a uma disseminação ao longo do organismo formando os cistos teciduais (Dubey et al., 1998).

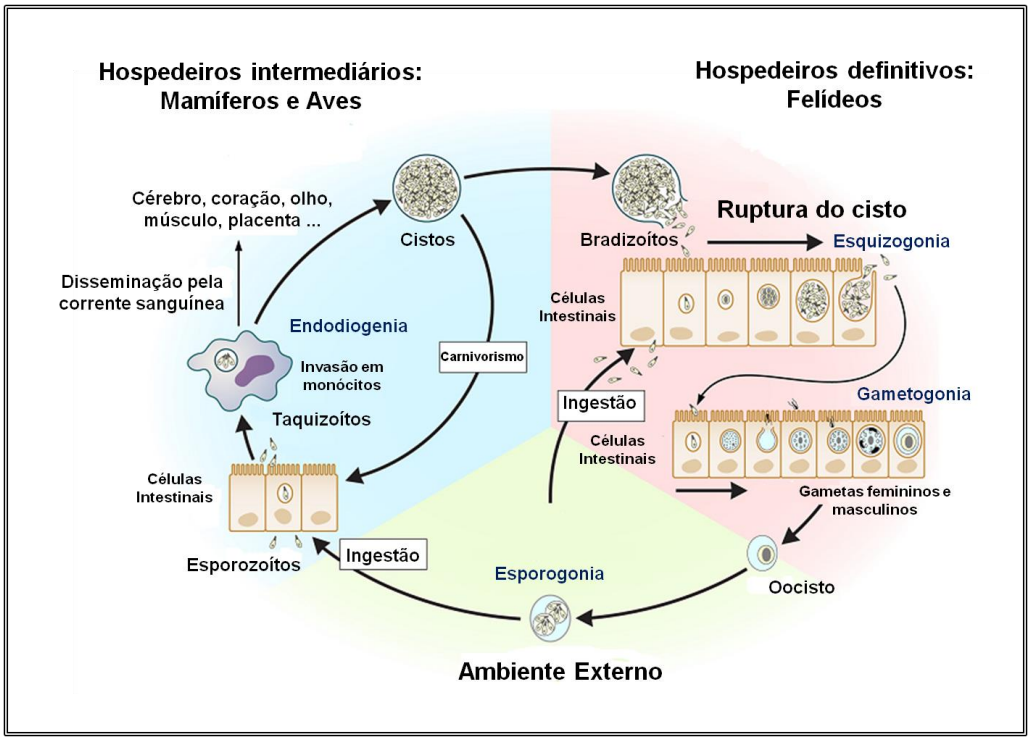


Figura 2: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* . Imagem modificada a partir de Robert-Gangneux e Dardé, 2012.

3.1.2 Transmissão da Toxoplasmose

A transmissão da toxoplasmose nos hospedeiros intermediários e definitivos pode ocorrer pela ingestão de oocistos esporulados provenientes do ambiente (água, solo, vegetais e frutas) (Elmore et al., 2010), por ingestão oral de cistos teciduais contidos em carne crua ou mal cozidas (Bayarri et al., 2010; Berger-Schoch et al., 2011), ou por transmissão transplacentária de taquizoítos (Dubey et al., 1998). Em humanos, a toxoplasmose também pode ser adquirida por transfusão de sangue, ou ainda por transplante de órgãos (Esch, Petersen, 2013) (figura 3).

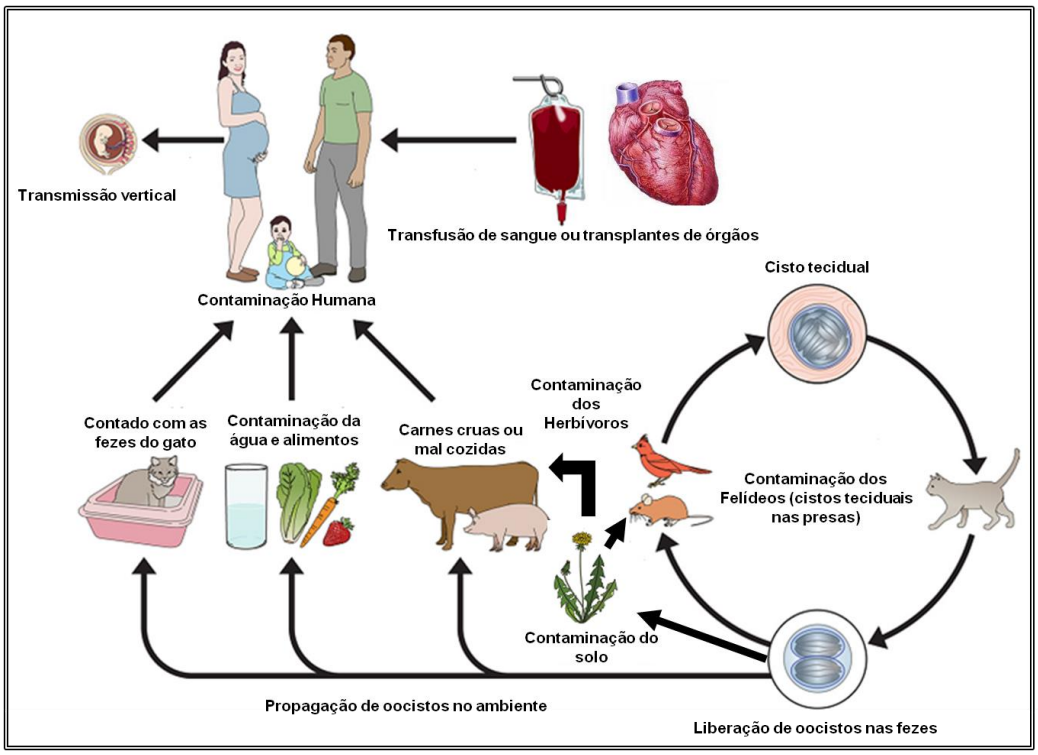


Figura 3: Diferentes vias de transmissão do *Toxoplasma gondii* nos hospedeiros definitivos e intermediários. Imagem modificada a partir de Esch e Petersen, 2013.

3.1.3 Toxoplasmose em imunocompetentes

A infecção primária com *T. gondii* em crianças e adultos, incluindo mulheres grávidas, é geralmente assintomática (Delair et al., 2008). No entanto, em cerca de 10% dos pacientes, a toxoplasmose provoca uma doença autolimitada e não específica com ativação imunológica (Montoya, Liesenfeld, 2004). Os indivíduos imunocompetentes podem desenvolver linfoadenopatia, linfonodopatia ou manifestações clínicas semelhantes à síndrome da monocleose infecciosa (Sepúlveda-Arias et al., 2014). Apesar da toxoplasmose ser uma doença benigna nos indivíduos imunocompetentes, a infecção por *T. gondii* pode levar a casos clínicos mais graves de pneumonite, miocardite, encefalite e lesões oculares graves (Dubey et al., 2012), principalmente em cepas híbridas (Leal et al., 2007). A toxoplasmose ocular adquirida nesses indivíduos pode desenvolver um quadro grave de coriorretinite, causando alterações oculares com graus variáveis de degeneração, lesões focais visivelmente brancas, reação inflamatória intensa ou lesões retinianas ativas (Montoya, Liesenfeld, 2004).

A toxoplasmose é uma importante zoonose em países europeus (Halsby et al., 2014). Um estudo epidemiológico recente realizado na Inglaterra, entre 2008 e 2012, notificou 1109 casos de indivíduos imunocompetentes com infecção por *T. gondii*, em que a maioria desses pacientes apresentou como sintoma a linfadenopatia ou lesões oculares (Halsby et al., 2014). Alguns fatores podem influenciar a epidemiologia da toxoplasmose como diferença comportamental, preferências alimentares regionais ou até mesmo hábitos de higiene ou saúde pública (Sepúlveda-Arias et al., 2014). No Brasil, os grandes surtos de toxoplasmose ocorreram, principalmente, por causa de alimentos ou água contaminados com o parasita (Vasconcelos-Santos, 2012) e foram recentemente revistos em nosso grupo (Meireles et al., 2015). Outros estudos relataram algumas variáveis correlacionadas à alta soroprevalência de toxoplasmose, com o consumo de água não filtrada, em Campos dos Goytacases-RJ, (Bahia-Oliveira et al., 2003) e o consumo de sorvete caseiro, em Cascavel-CE (Heukelbach et al., 2007). Além disso, a água contendo oocistos pode ser utilizada para irrigação agrícola ou em conjunto com pesticidas e herbicidas, contaminando vegetais crus e hortaliças (Kniel et al., 2002). Um estudo demonstrou a correlação entre o fator de risco associado ao consumo de vegetais frescos em restaurantes com a soroprevalência de toxoplasmose (Jafari et al., 2012) ou em surtos em empresas (Ekman et al., 2012).

Em indivíduos imunocompetentes com infecção crônica há a possibilidade da diminuição no desenvolvimento psicomotor (Havlícek et al., 2001), distúrbios e efeitos comportamentais (Flegr et al., 1996) e doença mental (Bachmann et al., 2005). Estudos recentes demonstraram a associação entre a infecção crônica pelo *T. gondii* e casos de transtorno bipolar e esquizofrenia (Emelia et al., 2012; Hamdani et al., 2013; Torrey et al., 2012).

3.1.4 Toxoplasmose em imunocomprometidos

A toxoplasmose é sempre uma ameaça à vida nos pacientes imunocomprometidos, seja qual for a cepa do agente envolvido na infecção, pois a resposta imune do hospedeiro é de primordial importância para o controle da infecção aguda, mas é incapaz de remover os cistos teciduais (Walle et al., 2013). A ausência de vários fatores responsáveis por imunidade celular ou humoral pode levar à toxoplasmose grave, e são profundamente prejudicadas nos indivíduos HIV

positivos (Rostami et al., 2014), pacientes transplantados (Derouin, Pelloux, 2008; Martina et al., 2011) ou com neoplasias (Alvarado-Esquivel et al., 2010; Wang et al., 2015). A infecção nesses indivíduos, na maioria dos casos resulta da reativação de uma infecção latente pré-existente de *T. gondii,* do que uma recém-infecção. Esta reativação é resultante da ruptura do cisto, e consequentemente há uma intensa proliferação dos parasitas, e devido à ineficiência do sistema imunológico do paciente, ocorre destruição principalmente dos tecidos adjacentes neurais ou do órgão transplantado, podendo levar o indivíduo à morte (Sepúlveda-Arias et al., 2014), mas em geral a doença é localizada no órgão afetado. A encefalite é um dos sintomas mais frequente nesses indivíduos imunocomprometidos (Antinori et al., 2004). Em doentes transplantados, a toxoplasmose pode resultar de uma reativação latente no destinatário ou uma infecção resultante de um órgão contendo cisto de um doador soropositivo em um receptor soronegativo (Martina et al., 2011). Em pacientes infectados com o vírus do HIV, a incidência de toxoplasmose é intimamente relacionada com a contagem de células T CD4, com um risco crescente quando essas células diminuem (Rostami et al., 2014).

3.1.5 Toxoplasmose congênita

A infecção congênita por *T. gondii* é a forma mais importante da doença, levando a casos de lesões inflamatórias que acarretam danos neurológicos permanentes, hidrocefalia, microcefalia e coriorretinite. A coriorretinite pode ser grave, podendo ocasionar a diminuição e até a perda total da visão (Grigg et al., 2015). Muitos recém-nascidos podem ou não apresentar sintomas após o nascimento, mas algumas sequelas podem se desenvolver durante a vida do paciente (Petersen, 2007).

Quando uma mulher grávida adquire uma infecção primária, os taquizoítos podem colonizar tecidos placentários durante o processo de proliferação e consequentemente ter acesso ao compartimento fetal em cerca de 30% dos casos (Abbasi et al., 2003). A frequência da transmissão vertical e a gravidade dos danos no feto depende da fase da gestação em que ocorre a infecção materna (Robert-Gangneux, Dardé, 2012).

No início da gravidez, a passagem dos taquizoítos pela barreira transplacentária é um evento raro, que ocorre em menos de 10% dos casos, porém

com consequências mais graves para o feto quando há a passagem de parasitas durante o primeiro trimestre (Robert-Gangneux, Dardé, 2012). Nessa fase ocorre intensa multiplicação do parasita com focos de necrose e forte inflamação, induzindo principalmente anormalidades nos tecidos do cérebro, na região ocular ou até mesmo causando aborto (Dubey et al., 2014). As principais manifestações clínicas incluem retardo mental, convulsões, microcefalia, hidrocefalia, surdez e deficiência psicomotora (Montoya, Remington, 2008). Ao longo da gestação a barreira transplacentária torna-se mais permeável, permitindo a transmissão do parasita em cerca de 30% dos casos no segundo trimestre, com uma infecção fetal que pode apresentar gravidade variável, com hepato-esplenomegalia, calcificação cerebral, epilepsia, anemia, erupção cutânea, distúrbios hepáticos, pneumonite ou coriorretinite (Montoya, Remington, 2008). No terceiro trimestre, em cerca de 60 a 70% dos casos ocorre a transmissão do *T. gondii* via placenta após a primo-infecção materna, mas a gravidade da doença é menor pela tamanho relativo e desenvolvimento do feto (Robert-Gangneux, Dardé, 2012).

3.1.6 Toxoplasmose em animais de consumo

Animais de consumo como bovinos, suínos, ovinos e caprinos são suscetíveis à infecção, e a contaminação de sua carne torna-se uma importante via de contaminação para o homem (Dubey et al., 2005). A população mundial de animais abatidos para consumo humano equivale a aproximadamente 56 bilhões de animais por ano, sendo que a infecção de sua carne com o protozoário patogênico *T. gondii* representa uma ameaça considerável para a saúde pública (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2014). Na pecuária a toxoplasmose ocasiona perdas econômicas consideráveis, já que a infecção pode causar doença congênita nos fetos resultando, em muitos, abortos e perdas econômicas (Dubey et al., 2005). A soroprevalência de *T. gondii* em animais de produção destinados ao consumo humano pode ser elevada, dependendo de como esses animais são criados ou ainda se esses animais apresentam contato direto ou indireto com os gatos e outros felídeos selvagens, o que aumenta o risco de contaminação por *T. gondii* (Herrmann et al., 2014). No Brasil, a prevalência da infecção em animais de produção é significativa (Meireles et al., 2003) especialmente em bovinos de produção extensiva, como em Rondonia (Cavalcante et al., 2006).

3.2 Resposta imunológica na Toxoplasmose

A infecção por *T. gondii* normalmente ocorre por via oral, por meio da ingestão de cistos teciduais em carne contaminada ou de oocistos presente em alimentos ou na água (Dlugońska, Grzybowski, 2012). O parasita segue uma rota no trato digestório do hospedeiro até a chegada à mucosa intestinal, em que o *T. gondii* invade a região intestinal infectando os enterócitos e ainda consegue atravessar o epitélio do intestino delgado e invadir outros tipos celulares, como as células dendríticas ou macrófagos (Egan et al., 2012). A invasão intracelular faz com que o parasita altere a fisiologia básica da célula hospedeira, como motilidade, migração, função de sinalização celular e até mesmo a via apoptótica (Laliberté, Carruthers, 2008). A infecção intracelular do *T. gondii* em macrófagos ou células dendríticas pode ativar receptores *Toll-like receptor* (TLR), a interação do TLR com o parasita é mediada por glicosilfosfatidilinositol (GPI), que está presente na superfície do *T. gondii*, essa ligação pode desempenhar um papel fundamental na formação da imunidade inata (Munoz et al., 2011). A produção da citocina IL-12 por muitas células inflamatórias, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, estimulam as células *natural killer* (NK) para produzir IFN-γ, um dos principais mediadores da resistência do *T. gondii* (Dupont et al., 2012).

As células do sistema imune inato são essenciais para o começo da resposta imunológica adaptativa, sendo inicialmente composta pelas células epiteliais da mucosa, que são a primeira linha de defesa do hospedeiro contra uma infecção oral por *T. gondii* (Lee, Ratajczak, 2009). A complexa ligação celular entre enterócitos, presença de muco e o próprio movimento peristáltico, estabelecem barreiras físicas contra a penetração de microrganismos intestinais (Woof, Mestecky, 2005). A resposta imune inata fornece mecanismos essenciais para rápida detecção e eliminação do patógeno (Stevenson, Riley, 2004). Na maior parte dos casos, com a rápida indução da resposta imune da mucosa, há a prevenção da replicação descontrolada do parasita e ocorre um estabelecimento da infecção latente com poucos danos no hospedeiro. Entretanto, doses altas de infecção podem resultar em uma resposta imune de mucosa desregulada provocando alterações locais e uma intensa resposta pró-inflamatória (Egan et al., 2012).

As células epiteliais da mucosa, além de ser uma barreira física, também apresentam uma função importante para a resposta imune, que é a produção de quimiocinas, que coordenam o recrutamento de células imunitárias (Ju et al., 2009). A população de linfócitos T intraepiteliais (IEL) presente no epitélio intestinal é implicada na homeostase dos tecidos de mucosa, como também pode contribuir para o aparecimento da patologia e da resposta pró-inflamatória durante a doença (Cheroutre et al., 2011). O epitélio subjacente e a lâmina própria apresentam um conjunto diversificado de células, como células dendríticas, células TCD4 e TCD8 e células B especializadas na produção de IgA secretória (S-IgA) (Sanos, Diefenbach, 2013). A mucosa intestinal apresenta tecidos linfóides organizados chamados placas de Peyer, que contêm linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas e células epiteliais especializadas chamadas células M, que têm como função realizar a transcitose de conteúdos luminais para as células dendríticas, que apresentam esses antígenos para as células T ativando a resposta imune adaptativa (Cohen, Denkers, 2015).

A imunidade adaptativa oferece uma resposta mais ampla e eficiente de reconhecimento antigênico (Pancer, Cooper, 2006). Essa imunidade envolve interações entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T e B (Cooper, Alder, 2006). Além da especificidade da resposta, a imunidade adaptativa apresenta a geração da memória imunológica, ou seja, após o primeiro contato com o antígeno, os conjuntos de células T e B são selecionados e consequentemente levam a formação de células de memória, que permanecerão por longo tempo. Caso ocorra um segundo contato com o mesmo patógeno, as células de memória são ativadas rapidamente, induzindo uma resposta mais rápida e eficiente contra o agente (Bonilla, Oettgen, 2010).

Uma resposta integrada de células $TCD4^+$, $TCD8^+$ e células B formam uma condição necessária para proporcionar imunidade específica e eficaz em longo prazo contra a infecção por *T. gondii*. Durante as fases iniciais da infecção, as células $TCD4^+$ contribuem para uma resposta específica por células B e células $TCD8^+$ (Munoz et al., 2011).

Células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos, células dendríticas e células B, adquirem o parasita por via da fagocitose, e apresentam antígenos do parasita via complexo MHCII/antígeno para linfócitos TCD4. As células $TCD4^+$ são necessárias para promover uma resposta de linfócitos B e a produção de anticorpos específicos, enquanto as células $TCD8^+$ efetoras são ativadas por

linfócitos TCD4$^+$ e após contato com as APCs tornam-se capazes de destruir células hospedeiras infectadas com *T. gondii* (Gazzineli et al., 1992). A resposta via células TCD8$^+$ também pode ser iniciada quando linfócitos TCD8 *naive* reconhecem o antígeno no complexo MHCI e juntamente com sinais coestimuladores promove a atividade citotóxica direta, que tem como função matar as células que contém parasitas intracelulares (Munoz et al., 2011).

Os anticorpos específicos são essenciais para a resistência do hospedeiro, embora sua ação se restrinja apenas ao reconhecimento de parasitas extracelulares. Entretanto, os anticorpos são essenciais quando ocorre a lise da célula hospedeira e a liberação dos parasitas (Erbe et al., 1991). Antes de invadir novas células, os anticorpos podem induzir a opsonização por células ativadas, facilitando a sua fagocitose e ativando a via complemento (Dupont et al., 2012).

Tanto as células TCD8$^+$ como as células TCD4$^+$ são cruciais para o hospedeiro sobreviver a longo tempo com a infecção crônica por *T. gondii,* eliminando as eventuais reativações induzidas pela ruptura ocasional de cistos do agente. (Miller et al., 2009). 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-12 (Bhopale, 2003). 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 opsonizantes (Bhopale, 2003).

Apesar da infecção intracelular com *T. gondii* induzir uma forte e duradoura resposta imune para o hospedeiro, esta não é suficiente para a eliminação do parasita, já que o mesmo pode sobreviver no hospedeiro em forma de cistos latentes (Dupont et al., 2012). A infecção primária com *T. gondii* estimula a produção de altos níveis de IL-12 e IFN-γ por células do sistema imune inato, que é responsável por limitar a expansão do parasita, ativar a resposta imune adaptativa e induzir a sobrevida do hospedeiro, mas em contradição, estimula a conversão dos taquizoítos para bradizoítos, levando à formação de cistos teciduais, onde os parasitas ficam intactos dentro da célula hospedeira (Aliberti, Bafica, 2005; Miller et al., 2009).

3.3 Vacinas para a Toxoplasmose

As perdas econômicas associadas à infecção por *T. gondii* em animais de consumo, o risco de transmissão do parasita aos animais e aos seres humanos, a reativação da doença e até mesmo o tratamento insatisfatório que muitas vezes está associado com o aumento da resistência a drogas disponíveis, justificam a variedade de estudos que tentam desenvolver uma vacina profilática eficaz para a toxoplasmose tanto para seres humanos como para animais (Hiszczynska-Sawicka et al., 2014). A vacinação poderia ser uma estratégia ideal para a prevenção da toxoplasmose, além disso, é uma maneira mais eficaz de combater doenças infecciosas e parasitárias (Siegrist, Aspinal, 2009).

Até o momento, não existe uma vacina eficiente para a doença em humanos, ou uma vacina que seja efetiva na diminuição da infecção em animais produtores de carne de consumo humano ou até mesmo em felinos domésticos ou selvagens (Bhopale, 2003). Atualmente a única vacina comercial para toxoplasmose é a TOXOVAX®, apesar de ser utilizada para a prevenção da doença em ovinos destinados a produção de lã (Buxton, 1993), essa vacina é considerada insegura para uso humano e para outros animais (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2014). Isto se deve por preocupações relacionadas à segurança, como por exemplo, a cepa atenuada utilizada na vacina pode recuperar a virulência e causar a doença grave, principalmente em animais jovens. Além disso, a vacina não apresenta alta viabilidade, pois apresenta um prazo de validade relativamente curto (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2014).

A infecção por *T. gondii* é capaz de conferir uma memória imunológica para os hospedeiros, portanto, uma vacina que induz imunidade similar à infecção pode ser altamente viável (Munoz et al., 2011). Várias estratégias de vacinação contra a toxoplasmose em modelos de roedores foram avaliadas nas últimas décadas, como vacinas inativadas (Mevelec et al., 2010), vacinas de proteínas recombinantes (Grzybowski et al., 2015), vacina de multicomponentes (Liu et al., 2014) e vacina de DNA (Lu et al., 2015). No entanto, vacinas eficazes e seguras continuam a ser um desafio, porque a maioria não tem sido capaz de conferir imunidade estéril contra a infecção, que normalmente está associada com a ausência de cistos teciduais após o desafio, e não só com o aumento da taxa de sobrevivência ou de infecção do hospedeiro vacinado (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2014). Uma vacina ideal para a

toxoplasmose deveria bloquear a infecção, induzir proteção contra novas infecções e não apresentar a formação de cistos nos tecidos, que está associado à fase crônica da doença e que está envolvida na patogênese das formas graves em imunossuprimidos (Campos et al., 2014) e na doença ocular (Rothova, 2003).

A construção de uma vacina eficaz contra um patógeno intracelular, como o *T. gondii*, deve estimular ambas as respostas efetoras da imunidade mediada por células e humoral (Dupont et al., 2012). A resposta imune mediada por células $TCD8^+$ e a produção de IFN-γ são fundamentais para controlar a infecção e consequentemente impedir a formação de cistos teciduais. (Gazzinelli et al., 1992). Enquanto as células $TCD8^+$ e o aumento de IFN-γ são mediadores importantes na resistência à infecção dentro de um hospedeiro já infectado, os anticorpos específicos produzidos por células B são essenciais para a resistência da doença em longo prazo (Sayles et al., 2000) e na proteção de mucosas (Mack, McLeod, 1992). Portanto, a produção de anticorpos específicos em conjunto com as respostas imunes celulares são características importantes na geração de imunidade adaptativa para *T. gondii* induzidas por vacina (Munoz et al., 2011).

Existem várias características desafiadoras no desenvolvimento de uma vacina para a toxoplasmose. Primeiramente, a expressão de proteínas em determinados estágios do parasita pode ser de fase específica, que podem direcionar as vacinas para a proteção na fase aguda, mas não para fase crônica, ou vice-versa (Dubey et al., 1998). Segundo, a diversidade de cepas de *T. gondii,* que apresentam genótipos e proteínas diferentes, e com isso a vacinação contra uma cepa em particular pode não ser protetora contra infecções com outras cepas (Jongert et al., 2009). Terceiro, o mecanismo de evasão do parasita tem sido resistente tanto para os tratamentos com drogas como na tentativa de vacinação para eliminar a infecção (Lim, Othman, 2014).

Uma vacina universal ideal que seja capaz de proteger todas as espécies hospedeiras contra todas as cepas do agente pode requerer múltiplos componentes de diversas cepas do parasita e até mesmo mais do que uma fase do ciclo de vida, o que configura um desafio difícil para o desenvolvimento de uma vacina segura e bem-sucedida (Hiszcznska-Sawicka et al., 2014). Além disso, uma vacina por via oral seria de grande importância para prevenir a infecção, pois é por meio desta via que ocorre a grande maioria da contaminação, tanto nos hospedeiros definitivos como nos intermediários (Dlugonska, Grzybowski, 2012). Seu uso, destinado

principalmente aos felinos, seria uma rota importante para impedir a transmissão da doença para outros animais, evitando a contaminação ambiental (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2014).

Há quase 60 anos foram desenvolvidos os primeiros modelos vacinais para a toxoplasmose, utilizando taquizoítos vivos, atenuados, mortos, lisados ou frações celulares solúveis (Hiszczynska-Sawicka et al., 2014). Esses tipos vacinais enfrentam alguns obstáculos inevitáveis, pois normalmente apresentam riscos de segurança, como a possibilidade de virulência, baixa imunogenicidade, problemas na administração deste tipo de imunógeno em individuos imunocomprometidos e geralmente baixa eficiência (Liu et al., 2012).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e com a compreensão da biologia celular do parasita, o foco atual das vacinas é a base de componentes subcelulares definidos do *T. gondii* (Jongert et al., 2009). Entre os antígenos do parasita, os alvos mais usados nos trabalhos de vacinação são as proteínas de superfície do agente (Chuang et al., 2013) ou proteínas que estão envolvidas no processo de invação celular (Chen et al., 2009). Normalmente, as preparações vacinais a partir de proteínas ou de subunidades são suplementados com adjuvantes potentes, que têm como finalidade de aumentar a imunogenicidade dos componentes da vacina (Powell et al., 2015). Por esta razão, o adjuvante tem um papel imunológico fundamental para o desenvolvimento de vacinas experimentais, e se torna cada vez mais complexo, muitas vezes até com o uso de proteínas individuais ou pequenos péptidos com função imune (Jongert et al., 2009).

Vacinas de proteínas recombinantes, peptídeos ou até mesmo de DNA, geralmente não apresentam os aspectos gerais e usuais que são provocados normalmente em uma infecção natural por meio dos componentes do agente patogênico, sendo que a maioria desses componentes mantidos em vacinas atenuadas ou vivas parecem ser essenciais para uma melhor imunidade, como no caso da vacina para Malária (Hoffman et al., 2010). Entretanto, quando esses componentes estão ausentes, em formulações vacinais recombinantes, eles podem ser substituídos por associações adjuvantes, porém existem poucos adjuvantes que são licenciados para o uso em humanos, por indução de toxicidade e autoimunidade (Ishii, Akira 2007).

3.4 Radiação ionizante como ferramenta para produção de vacinas

A radiação ionizante tem sido considerada uma ferramenta ideal para a produção de imunógenos por promover o bloqueio da reprodução do parasita no hospedeiro mantendo suas características iniciais de biologia celular. Parasitas irradiados induzem um alto nível de imunização por manter a viabilidade do agente e a correta imunogenicidade (Wales, Kusel, 1992).

A radiação ionizante consiste em ondas eletromagnéticas que apresentam energia suficiente para interagir com os átomos do meio por onde ela se propaga, com capacidade de promover ionização e excitação, além de possuir alto poder de penetração (Grosh, Hoopywood, 1979). Os efeitos da radiação ionizante podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos diretos ocorrem quando os raios-γ interagem diretamente com o alvo molecular. Já nos efeitos indiretos, há uma interação secundária, ou seja, os raios-γ interagem com moléculas do meio (Robbins, Zhao, 2004). A molécula de água é a mais abundante em um organismo biológico, além do mais, a água participa praticamente de todas as reações metabólicas. A interação da radiação com as moléculas de água resulta em um processo conhecido como radiólise da água, em que ocorre a formação de novas moléculas, como 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 moléculas produzidas pela radiólise da água podem reagir com os ácidos nucléicos, lipídios ou proteínas da célula, provocando alterações nessas moléculas e ampliando os efeitos diretos da radiação (Wales, Kusel, 1992).

Os efeitos da radiação ionizante em proteínas podem causar alterações químicas, como fragmentação, reticulação, agregação ou oxidação da proteína. Essas modificações são decorrentes principalmente por radicais de oxigênio gerados na radiólise da água (Woods, Pickaev, 1994). Essas alterações dependem da natureza química da proteína, estado físico, concentração da proteína, presença de oxigênio e a condição de irradiação (Woods, Pickaev, 1994). As alterações químicas, que normalmente são irreversíveis, podem afetar a conformação e a estrutura da proteína levando a modificação das propriedades biológicas (Moon, Song, 2001). Os efeitos da radiação nas células relacionadas com essas alterações protéicas induzidas pela ação direta ou indireta da radiação são sugestivos para

uma melhor resposta imunológica, devido à oxidação das proteínas, levando a uma fagocitose preferencial por células imunes por meio de receptores do tipo *scavengers*, sendo uma importante ferramenta para a produção de imunógenos (Cardi et al., 1998).

Outras moléculas que podem ser alteradas pelos efeitos da radiação são os lipídios. Essas estruturas celulares são atingidas principalmente pelos radicais livres produzidos pela radiólise da água. Uma das principais causas é que esses radicais livres interagem com as membranas biológicas levando a desagregação e alteração de estruturas das membranas celulares, consequentemente 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, em que o processo ocorre principalmente dentro da membrana celular, que apresenta alta concentração de ácido graxos poli-insaturados, como as membranas das mitocôndrias, sendo assim mais suscetíveis à peroxidação lipídica, tendo como consequência a perda de sua integridade e a diminuição no funcionamento celular (Manzi et al., 2003).

A deposição de energia da radiação, que pode interagir de maneira direta (ionização) ou indireta (por meio do ataque de radicais livres) na molécula de DNA, induz danos irreversíveis para a célula, que geralmente está associada a quebras da dupla fita de DNA ou mutações gênicas. A morte celular induzida por radiação normalmente é mais tardia e atribuída a uma falha na reparação do DNA, principalmente nas quebras da dupla fita, resultando em uma falha mitótica (Coates et al., 2004). Em decorrência do processo de diferenciação celular, apenas uma parcela das moléculas de DNA codifica genes ativos, assim, a probabilidade de que genes funcionais que tenham sua estrutura alterada após a exposição é relativamente pequena, mantendo-se funcionais mesmo em cromatides fragmentadas. Dessa maneira, as quebras podem ser acumuladas sem que as células manifestem qualquer efeito, mas no momento da mitose, a falha na distribuição dos genes induz a morte das células filhas (Lorimore et al., 2003).

A utilização da radiação ionizante, com intuito de produzir vacinas com parasitas irradiados, já foi associada a uma variedade de parasitas, como *Schistosoma mansoni* (Wales, Kusel, 1992); *Opisthorchis viverrini* (Papatpremsiri et al., 2014), *Giardia lamblia* (Sundermann, Estridge, 2010), *Plasmodium falciparum* (Hoffman, Doolan 2000), *T. gondii* (Hiramoto et al., 2000). Nesses organismos, a

radiação afeta principalmente a capacidade da reprodução ou até mesmo da diferenciação do parasita, que normalmente estão associados no desenvolvimento da patologia, sugerindo que o dano principal para esse efeito esteja nos ácidos nucleicos dos agentes (Mirzayans et al., 2013).

A radiação ionizante em *T. gondii* 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). Hiramoto e colaboradores (2000) desenvolveram um modelo vacinal para a toxoplasmose utilizando a radiação ionizante, onde os taquizoítos de *T. gondii* irradiados não apresentam alterações biológicas ou morfológicas, como síntese de DNA e proteínas, estruturas celulares não são afetadas, e nem o processo de invasão celular do parasita.

O desenvolvimento de uma vacina para a toxoplasmose utilizando a radiação ionizante permite a esterilização dos parasitas, impedindo sua multiplicação no interior da célula hospedeira sem promover uma infecção, induzindo uma resposta imune similar à infecção natural e ainda sem a formação de cistos teciduais. A dissecção da imunidade contra a doença e contra a infecção poderá resultar na produção de uma vacina potencialmente mais eficiente, útil e segura para a prevenção da toxoplasmose humana ou veterinária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitas e animais experimentais

Foram utilizados taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (tipo I) mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por passagens sucessivas, com intervalos de 3 a 4 dias, em camundongos Swiss (não-isogênicos) ou C57BL/6J (isogênicos). Os animais previamente infectados foram sacrificados em câmara de CO_2, e o peritônio do animal foi lavado com 5 mL de solução salina ou salina tamponada com fosfato - NaCl 0,15 M/tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2 (PBS), contendo gentamicina (40 µg/mL). Após a contagem em câmara de Neubauer, os taquizoítos foram diluídos apropriadamente, e cada animal recebeu 10^7 taquizoítos, por inóculo intraperitoneal (i.p.).

A cepa do tipo II (ME-49) de *T. gondii*, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Fausto Araújo (UCLA), e a cepa do tipo III (VEG) de *T. gondii*, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Hélio Langoni (UNESP) são mantidas no Laboratório de Protozoologia (IMTSP/USP), por passagens sucessivas, com intervalos de 30 a 45 dias em camundongos Swiss ou C57BL/6J. Animais cronicamente infectados foram sacrificados em câmara de CO_2 e os cérebros retirados e macerados em solução salina. Uma alíquota da suspensão cerebral (20 µL) 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.

Para os experimentos de imunização, foram utilizados camundongos machos isogênicos BALB/c, com peso entre 20 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada e recebendo 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 cuidado de animais de laboratório e com os "Princípios de Ética em Experimentação Animal" (Sociedade Brasileira de Zootecnia Laboratório SBCAL). Todos os protocolos de animais, incluindo a eutanásia foram submetidos e aprovados pelo Conselho de

Ética de Experimentação Animal - Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo (ICB / USP) sobnúmero de protocolo 100/11.

4.2 Obtenção de antígenos extrato total de *T. gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente inoculados e submetidos à sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester® (Rochester Inc., New York, USA), a 40 ciclos por 5-10 períodos de 30 s em banho de gelo, até a lise completa dos agentes. Em seguida, foi acrescentado solução de NaCl 0,3 M para isotonizar a suspensão. E após esse procedimento, foram submetidos à centrifugação a 10.000 *g* por 30 min 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). Em seguida as alíquotas foram mantidas a -20 °C até o momento dos ensaios de ELISA e cultura celular.

4.3 Irradiação dos taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*

Para obtenção das preparações vacinais, foram utilizados taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de animais previamente infectados por meio do lavado peritoneal com solução salina. Após a remoção dos parasitas, a solução salina contendo os parasitas foi submetida a uma centrifugação 700 g por 10 minutos a 4 °C. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em volume adequado de meio de cultura RPMI 1640, os parasitas foram mantidos em banho de gelo e submetidos à irradiação, nas doses de 255 Gy com blindagem de 70%, pela exposição a raios-γ de uma fonte de Cobalto 60 (Gammacell®, Atomic Energy of Canada, Pinawa, CA), de forma homogênea, com presença de O_2 a uma taxa de dose de 1,03 kGy/h.

As amostras, após irradiação, foram adicionadas 10% de soro fetal bovino estéril e 10% dimetilsulfóxido (DMSO - Fisher BioReagents™ - Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) com ajuste para uma concentração final de 10^8 taquizoítos/mL. As amostras aliquotadas em tubos plásticos de congelamento foram mantidas por 24h à temperatura de –80 °C e em seguida transferidas para nitrogênio líquido (–196

°C), até o momento do uso (Hiramoto et al., 2002). Nenhuma adição de lipídios emulsões ou outros tipos de adjuvantes ocorre nesta preparação.

4.4 Imunização dos camundongos BALB/c

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados por via oral (v.o.) ou por via intraperitoneal (i.p.) (Hiramoto et al., 2002) com três doses a cada 15 dias com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy de cobalto 60. Animais imunizados por v.o. receberam junto com os taquizoítos uma solução (v/v) de hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) 6% Aziram® (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embú-Guaçu, SP, BR) por sonda gástrica, para preservação dos parasitas na parte inicial do trato digestório (Galisteo, 2008). Este tipo de hidróxido de alumínio funciona apenas como antiácido, não tendo a incorporação de antígenos como os alumens utilizados como adjuvantes imunológicos.

4.5 Desafio e extração de DNA do tecido cerebral de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral, com diferentes cepas cistogênicas de *T. gondii*

Camundongos BALB/c imunizados com 3 doses de 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados por via intraperitoneal ou por via oral foram desafiados após 90 dias da última dose, com 10 cistos da cepa ME-49 (tipo II) e outro grupo de camundongos receberam 10 cistos da cepa VEG (tipo III). 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 solução salina. A solução contendo cérebro foi submetida à extração de DNA para análise da quantificação absoluta de parasitas por *real time* PCR (7500 real time PCR System/Applied Biosystems®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). A extração de DNA foi realizada com o kit DNA mini QIAamp® (QIAGEN, Valencia, CA) o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Análise por Real time PCR da quantificação absoluta de parasitas em tecido cerebral de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral, desafiados com diferentes cepas cistogênicas de *T. gondii*

A análise da quantificação absoluta de parasitas no cérebro de camundongos imunizados por via intraperitoneal ou por via oral, com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados e desafiados com cepas cistogênicas ME-49 ou VEG de *T. gondii* foi realizada por real time PCR (7500 real time PCR System/ Applied Biosystems®). Para a detecção do DNA do parasita foram utilizados primers B1JW63 e B1JW62 juntamente com Power SYBR® Green Master Mix Applied Biosystems® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA), o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O termociclador foi programado para realizar 95 °C por 10 minutos, 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto e seguido de um passo de denaturação. Foi construída uma curva padrão utilizando $1,2x10^5$ taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* por mL, com um fator de diluição 1:4. Todas as amostras foram testadas em triplicatas. A quantidade de parasitas foi determinada automaticamente pelo 7500 software (Applied Biosystems®).

4.6.1 Confecção dos Primers

Os primers (tabela 1) foram desenhados utilizando software Primer 3 e as sequências obtidas no banco de dados NCBI Nucleotide Databases. Para utilização no ensaio de real-time PCR, todos os primers foram testados e as reações padronizadas.

Tabela 1: Sequência de primers (B1 do *Toxoplasma gonii)* utilizado no real time PCR.

Primer	Sequência	Produto (pb)
B1JW63	GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG	24
B1JW62	TTCTCGCCTCATTTCTGGGTCTAC	

4.7 ELISA para a detecção de anticorpos totais e de alta afinidade IgG, IgM e IgA específicos no soro dos camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal ou por via oral com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60

Foram utilizadas placas de poliestireno Costar® (Corning Inc, Lowell, USA) de 96 poços sensibilizadas com 100 μL de antígeno de extrato total de *T. gondii* (1 μg/mL), suspenso em tampão carbonato de sódio (Na_2CO_3 e $NaHCO_3$) 0,1 M pH 9,5, *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes em lavadora de microplacas hydroSpeed™ (TECAN, Männedorf, Schweiz) com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBST) e bloqueadas com solução PBST contendo 0,3% de leite durante 1 h em estufa a 37 °C. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas com PBST, e após esse processo foram depositados na placa 100 μL de soro numa diluição 1/100 dos camundongos imunizados e incubados a 37 °C por 1 h. As placas foram lavadas cinco vezes com PBST e foram aplicados 100 μL/poço de diluições de conjugado anti-IgG (1:20000), anti-IgA (1/10000) e anti IgM (1/10000) de camundongo marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) com uma incubação de 1 h a 37 °C. Para a detecção de anticorpos de alta afinidade foram adicionados 100 μL/poço de solução caotrópica (ureia 6 M) antes da etapa do conjugado, por 15 minutos na estufa a 37 °C. Após esse período as placas foram lavadas (5 vezes com PBST) e incubados com 100 μL/poço de conjugado com diluição apropriada, com uma incubação de 1 h a 37 °C. Depois de novas lavagens (cinco vezes), a revelação da reação foi realizada pela adição de 100 μL/poço de TMB (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine Dihydrochloride - tablets) (Sigma-Aldrich®), com 2 μL de H_2O_2 30% em tampão fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0 por 30 minutos e interrompida pela adição de 50 μL de H_2SO_4 2 M. A absorbância de cada poço foi determinada em espectofluorímetro Filter Max F5® – (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 450nm.

4.8 Marcação de superfície de células esplênicas e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto de 60 por via intraperitoneal e por via oral

As células esplênicas e do sangue periférico foram obtidas de camundongos imunizados por via intraperitoneal e por via oral com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados, 15 dias após a terceira dose, camundongos infectados cronicamente com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* (30 dias após de infecção) e camundongos não imunizados. Os órgãos foram dissociados de maneira estéril em fluxo laminar, em meio de cultura RPMI 1640. O sangue periférico foi obtido por punção cardíaca, e as células mononucleadas tanto no sangue como no baço foram separadas por Ficoll-Paque™ Premium 1084 (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, EUA), essa separação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Terminada a separação celular, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura, contadas em câmera de Neubauer e, por fim, ajustadas numa concentração de 10^6 células. Depois desse esse procedimento as células foram submetidas à marcação de superfície celular, para fenotipagem das populações celulares. Foram utilizados anticorpos monoclonais *anti-mouse* como: anticorpos anti-CD3 Pacific blue (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), anti-CD4 Horizon V500 (BD Biosciences), anti-CD8 APC-H7® (BD Biosciences); anti-CD44 APC (BD Biosciences); anti-CD45RB FITC (BD Biosciences); anti-CD69 PE (BD Biosciences), anti-CD19 PE-Cy7 (BD Biosciences) e anti-CD23 FITC (BD Biosciences). Para realizar a marcação foi preparada um mix de anticorpos de acordo com as possibilidades dos filtros, sendo utilizado uma diluição 1:50 de cada anticorpo em solução de BD FACSFlow Sheath Fluid™ (BD Biosciences), foram adicionados 20 µL dessa solução em cada amostra, e em seguida foram incubadas por 30 minutos a 4 °C na ausência de luz. Após esse período foi adicionado 300 µL da solução de BD FACSFlow Sheath Fluid™ (BD Biosciences) e realizada a análise no citômetro de fluxo LSRFortessa® (BD Biosciences). Para a compensação foi utilizado CompBeads® *anti-Rato* e *anti-Hamster* (BD Biosciences). Os dados foram coletados em BD FACSDIVA® (BD Biosciences) software e analisados em Flowjo X® software (FlowJo, LLC, Ashland, OR, EUA).

4.9 Estratégia de análise para determinar as populações celulares esplênicas e do sangue periférico de camundongos imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal ou por via oral

Para analisar a população de linfócitos T *helper* (figura 4), linfócitos T citotóxicos (figura 5), linfócitos B (figura 6) e plasmócitos (figura 7) do baço e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados foi utilizada a estratégia de *gates* esquematizada abaixo. As populações celulares foram expressas em número absoluto de células, que foi o resultado das multiplicações dos *gates* de cada população multiplicado pelo número total de células do órgão, assim, temos o número absoluto de cada população celular. Para a análise de ativação celular de cada população de linfócitos avaliamos a média da intensidade de fluorescência (MFI) de cada fluocromo marcado com os respectivos anticorpos: anti-CD44 marcado com APC, anti-CD45RB marcado com FITC, anti-CD69 marcado com PE e anti-CD23 marcado com FITC.

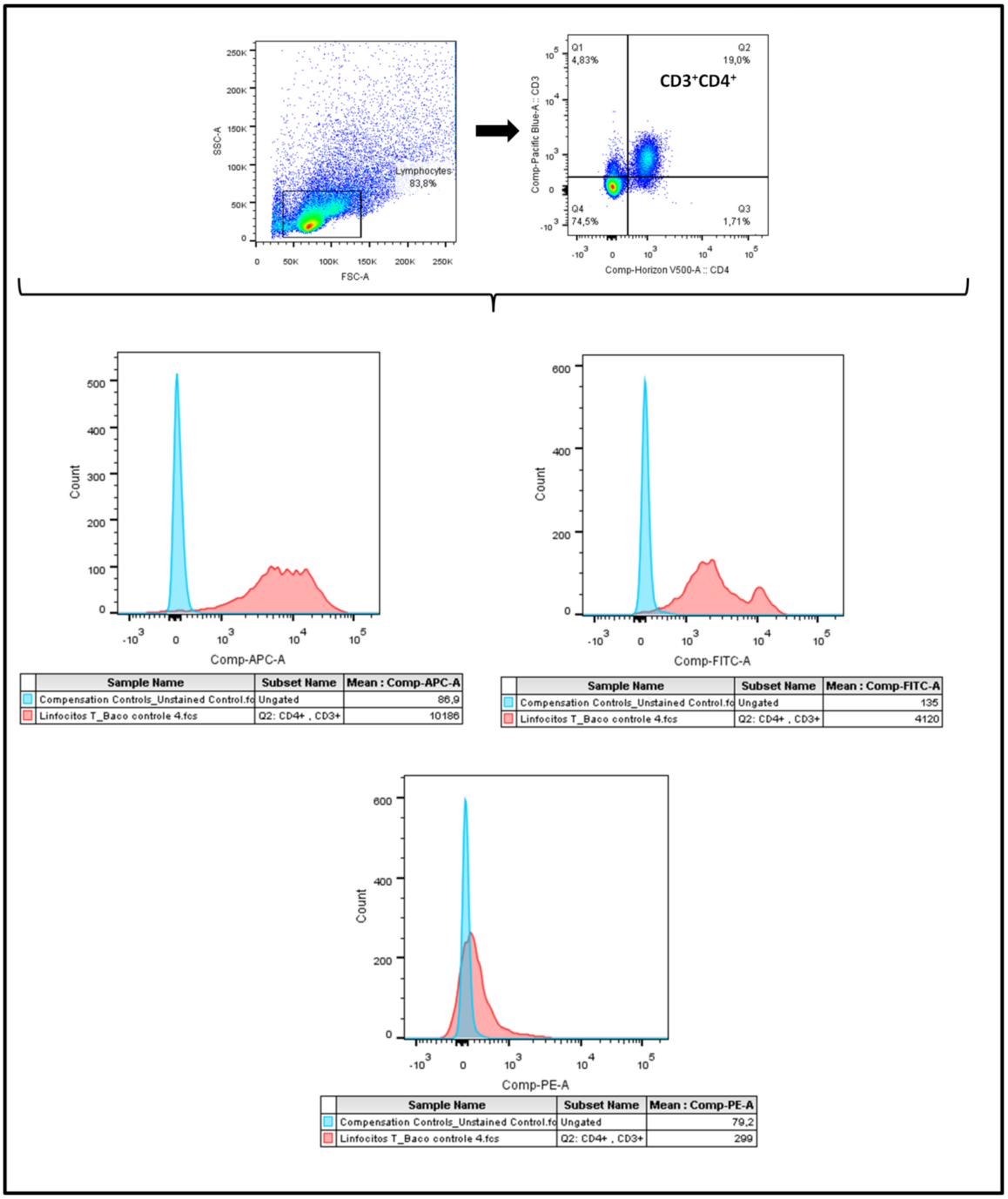


Figura 4: Estratégia de análise para linfócitos T *helper* do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle. A análise foi realizada com aquisição de 50.000 eventos.

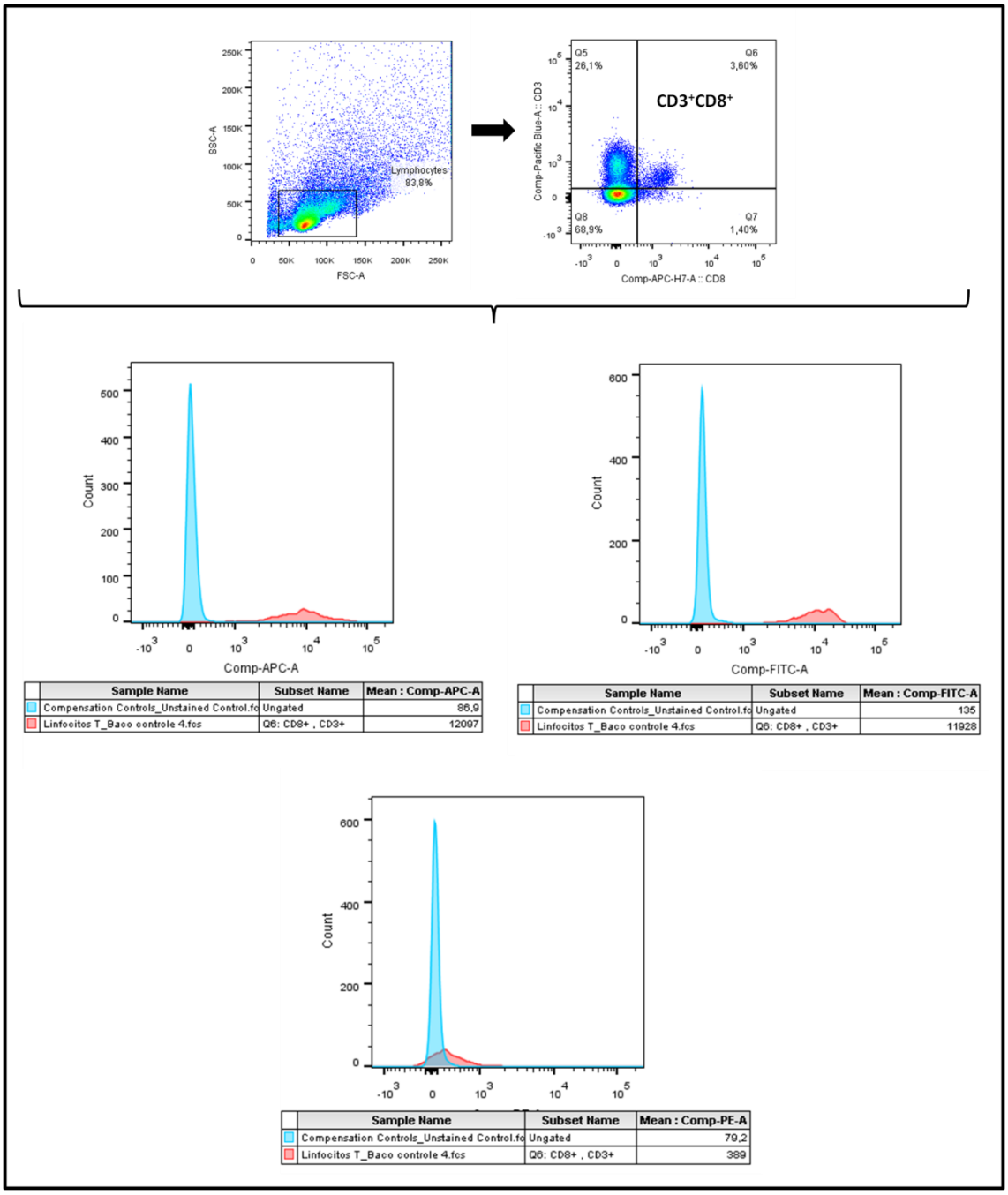


Figura 5: Estratégia de análise para linfócitos T citotóxicos do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle. A análise foi realizada com aquisição de 50.000 eventos.

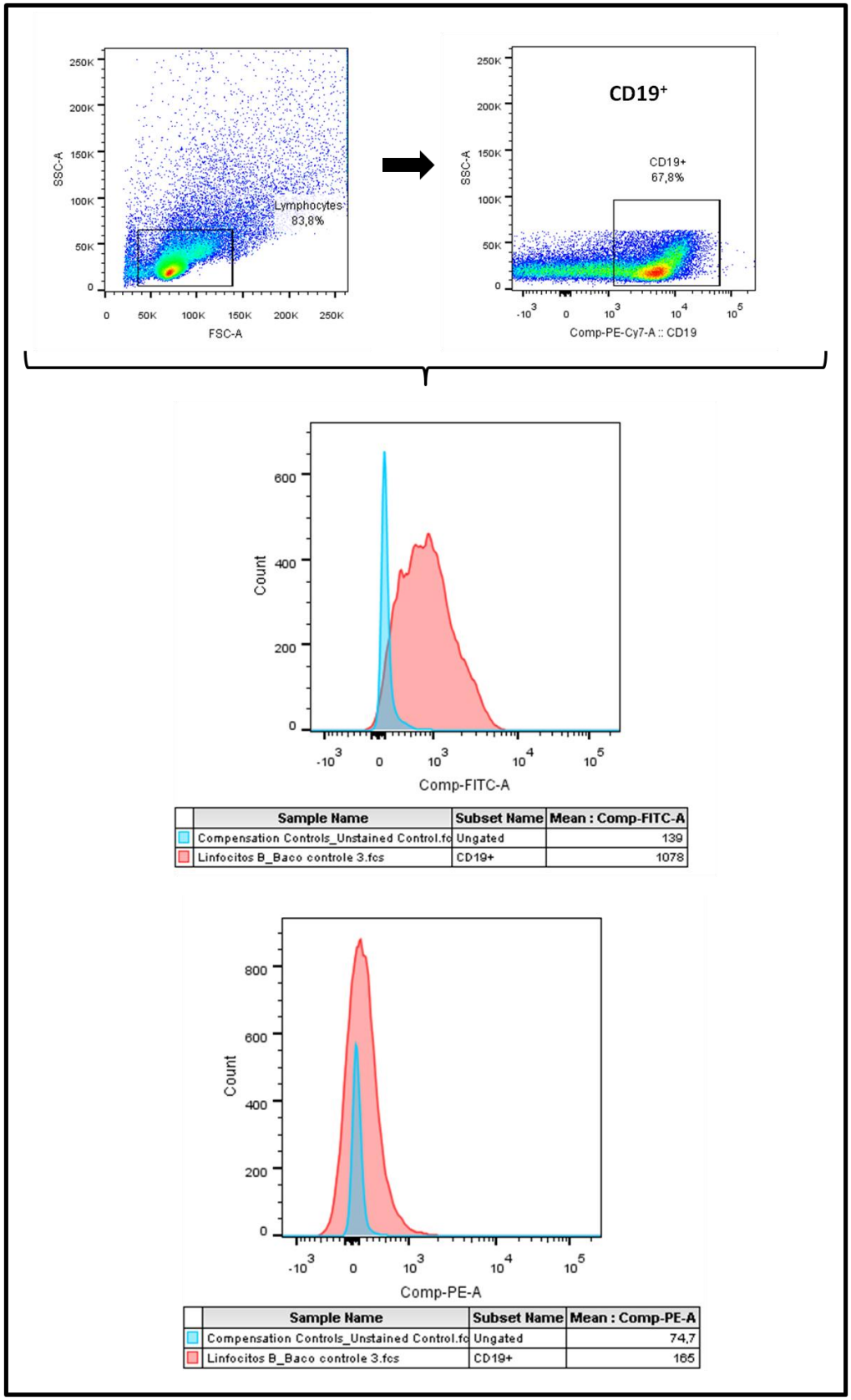


Figura 6: Estratégia de análise para linfócitos B do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle. Analise foi realizada com aquisição de 50.000 eventos.

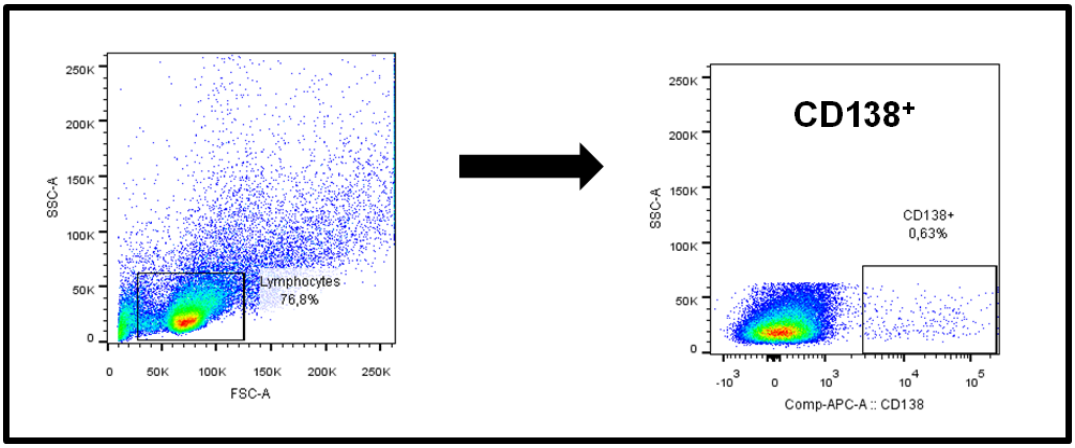


Figura 7: Estratégia de análise para plasmócitos do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle. Analise foi realizada com aquisição de 50.000 eventos.

4.10 Proliferação celular de linfócitos TCD4 ($CD3^+CD4^+$), linfócitos TCD8 ($CD3^+CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) no baço de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral

As células esplênicas foram obtidas de camundongos imunizados por via intraperitoneal e por via oral com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados 15 dias após a terceira dose, camundongos infectados cronicamente com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* (30 dias de infecção) e camundongos não imunizados. Os órgãos foram dissociados de maneira estéril em fluxo laminar, em meio de cultura RPMI 1640. As células mononucleadas do baço foram separadas por Ficoll-Paque™ Premium 1084 (GE Healthcare), a realização da separação celular foi realizada de acordo com o fabricante. Finalizada a separação celular, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura, contadas em câmera de Neubauer e, por fim, ajustadas numa concentração de $4x10^6$ células. Foi adicionada uma diluição apropriada de 5-6 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) a 5 µM, e as células foram incubadas na estufa com 5% de CO_2 a 37 °C por 5 minutos, após esse período as células foram agitadas para a marcação homogênea das células e mantidas novamente na estufa por 5 minutos. Depois da marcação foi adicionado meio de cultura com 10% de soro fetal bovino, no volume 5 vezes maior que a solução celular inicial. Terminado esse procedimento, as células foram submetidas à centrifugação de 2000 rpm por 8 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 10 mL de meio de cultura RPMI e centrifugadas

novamente, o pellet foi ressuspendindo em 1 mL de meio de cultura RPMI com 10% de soro bovino fetal. E por fim, as células foram colocadas em placas de cultura de poliestireno TPP® (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) de 24 poços e receberam os estímulos de antígeno extrato total de *T. gondii* (10 µg/mL - estimulo específico), e concavalina A (5 µg/mL – estímulo inespecífico) e sem estímulo (basal), células não marcadas com CFSE também foram preparadas e mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C por 6 dias. Logo depois do período de incubação, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 8 minutos, e o pellet ressuspendido em 200 µL de BD FACSFlow Sheath Fluid™ (BD Biosciences). Para análise da proliferação de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), e linfócitos B ($CD19^+$) do baço, as células foram submetidas à marcação de superfície celular com os anticorpos específicos para cada população: anti-CD3 Pacific blue (BD Biosciences®); anti-CD4 Horizon V500 (BD Biosciences®); anti-CD8 APC-H7 (BD Biosciences®) e anti-CD19 PE Cy7 (BD Biosciences®). Foi preparado um mix de anticorpos, onde cada anticorpo foi diluído (1:50) em solução de BD FACSFlow Sheath Fluid™ (BD Biosciences®), e cada amostra recebeu 20 µL da solução com os anticorpos. As células foram incubadas por 30 minutos, a 4 °C e na ausência da luz. Após esse período as células foram submetidas à análise no citômetro de fluxo (LSRFortessa BD Biosciences®). Para a compensação foi utilizado CompBeads® *anti-Rato* e *anti-Hamster* (BD Biosciences). Os dados foram coletados em FACSDIVA® (BD Biosciences®) software e analisados em Flowjo X® software.

4.11 Estratégia de análise para determinar a proliferação celular de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) do baço de camundongos imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal ou por via oral

Para analisar a proliferação de linfócitos T *helper* (figura 8), linfócitos T citotóxicos (figura 9) e linfócitos B (figura 10) do baço de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados foi utilizada a estratégia de *gates* esquematizada abaixo.

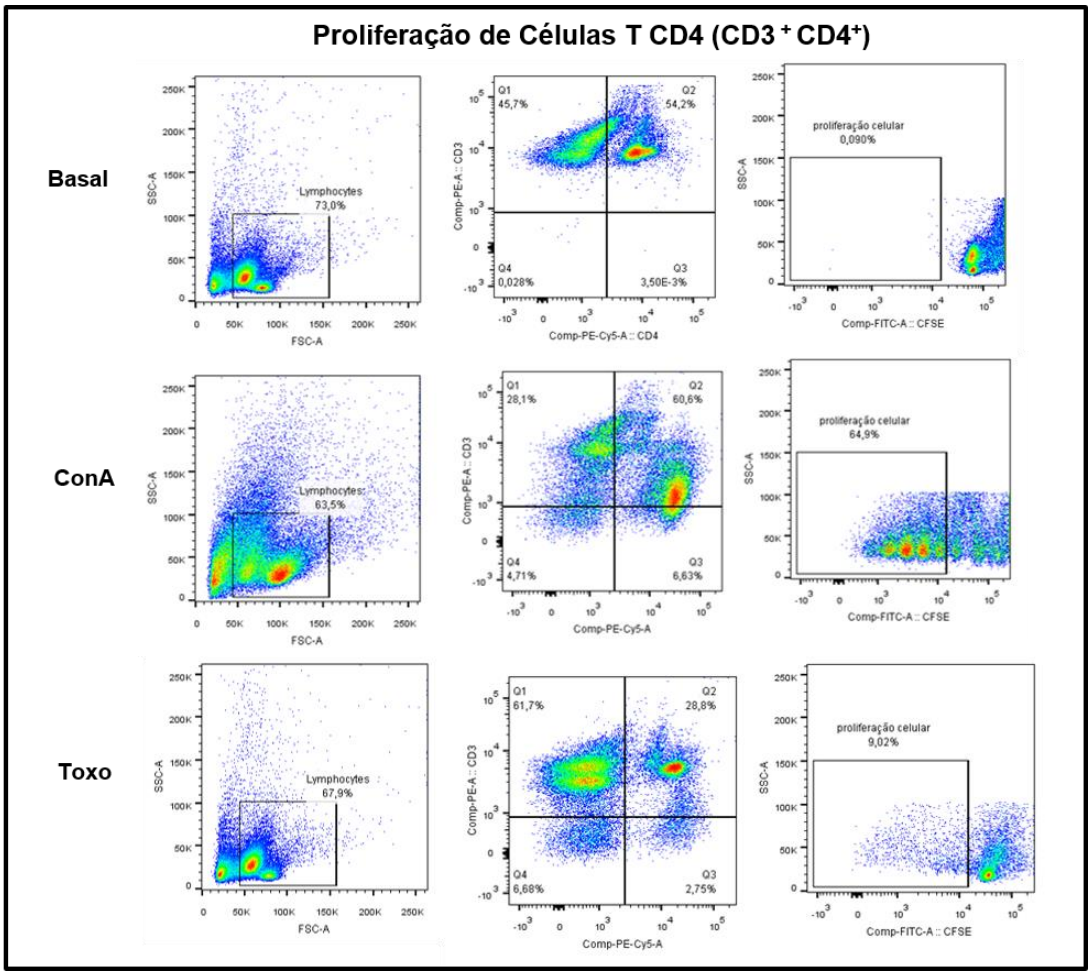


Figura 8: Estratégia da análise da proliferação de células T CD4 ($CD3^+CD4^+$) do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle. Basal – céulas esplênicas sem estímulo; ConA - células esplênicas estimuladas com ConA (estímulo inespecífico); Toxo – células esplênicas estimuladas com antígeno proteico de *T. gondii* (estímulo específico). Analise foi realizada com aquisição de 50.000 eventos.

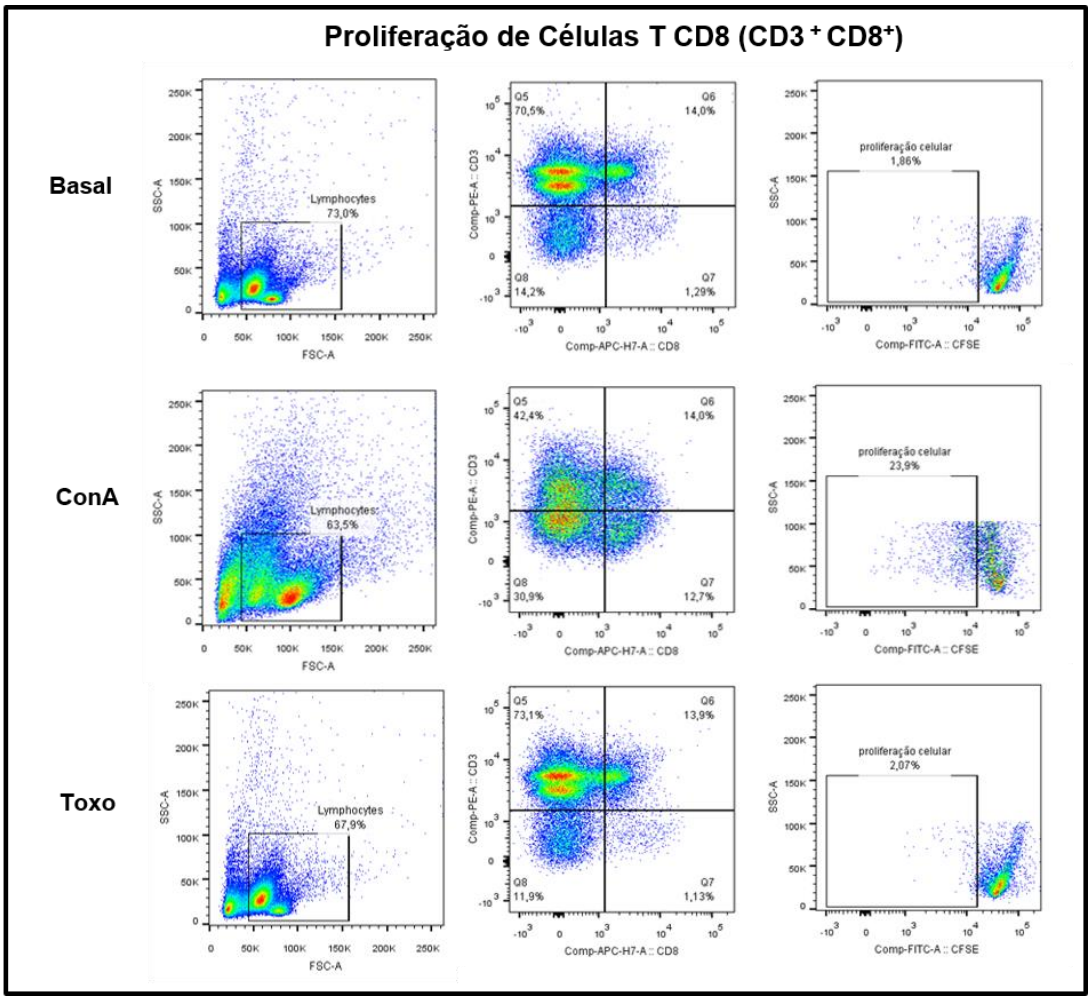


Figura 9: Estratégia da análise da proliferação de células T CD8 ($CD3^+CD8^+$) do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle. Basal – céulas esplênicas sem estímulo; ConA - células esplênicas estimuladas com ConA (estímulo inespecífico); Toxo – células esplênicas estimuladas com antígeno proteico de *T. gondii* (estímulo específico). Analise foi realizada com aquisição de 50.000 eventos.

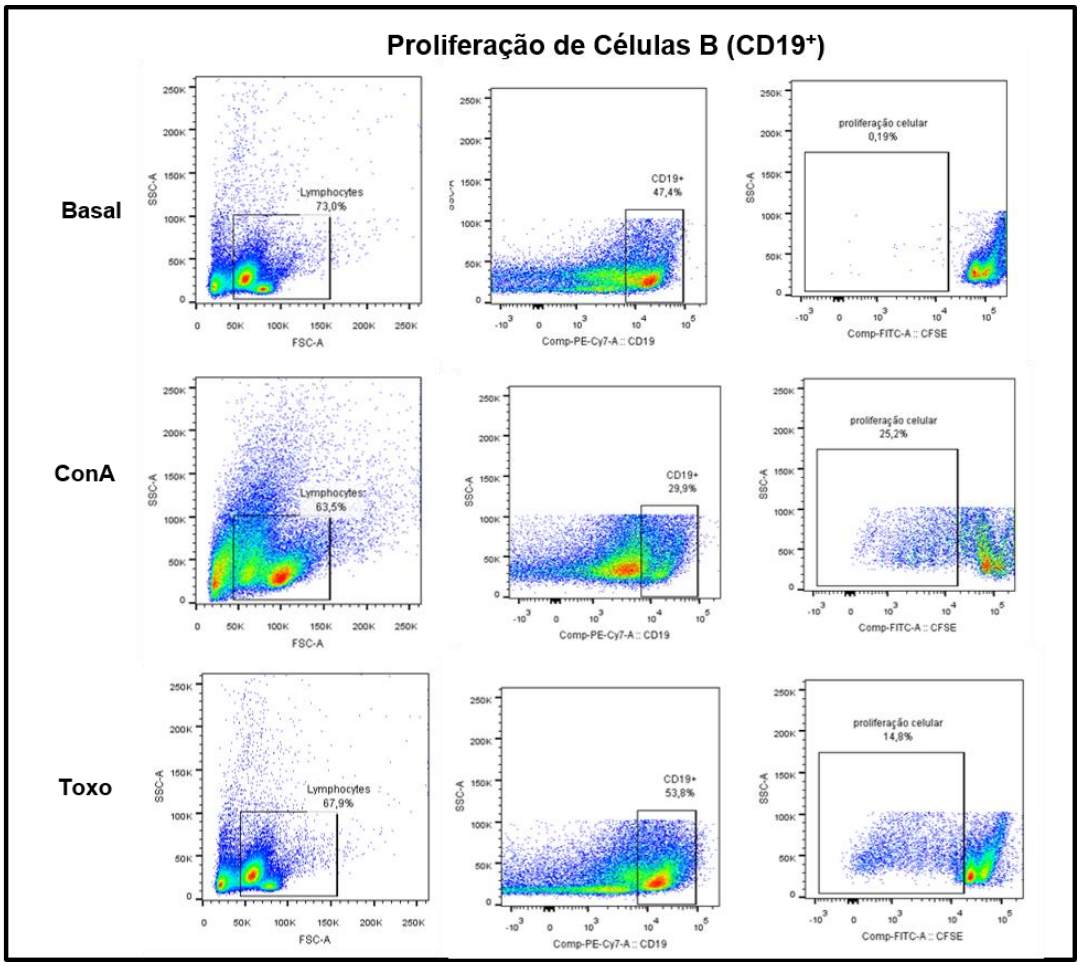


Figura 10: Estratégia da análise da proliferação de células B ($CD19^+$) do baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal, por via oral, camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 e camundongos BALB/c controle. Basal – céulas esplênicas sem estímulo; ConA - células esplênicas estimuladas com ConA (estímulo inespecífico); Toxo – células esplênicas estimuladas com antígeno proteico de *T. gondii* (estímulo específico). Analise foi realizada com aquisição de 50.000 eventos.

4.12 Produção de citocinas IFN-γ, IL-10, IL-2, IL-4, IL6, IL-17A e TNF-α por células esplênicas e do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via intraperitoneal e por via oral

As células esplênicas e do sangue periférico foram obtidas de camundongos imunizados por via intraperitoneal e por via oral com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados (15 dias após a terceira dose), camundongos infectados cronicamente com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* (30 dias após a infecção) e camundongos não imunizados. Os órgãos foram dissociados de maneira estéril em fluxo laminar, em meio de cultura RPMI 1640. O sangue periférico foi obtido por punção cardíaca, e as células mononucleadas tanto no sangue como no baço foram

separadas por Ficoll-Paque™ Premium 1084 (GE Healthcare®), a separação celular foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Após a separação celular, as células foram ressuspendidas em 1mL de meio de cultura, contadas em câmera de Neubauer e, por fim, ajustadas numa concentração de $2x10^6$ células. As células foram colocadas em placa de cultura de poliestireno TPP® e estimuladas com 10 µg/mL de antígeno de extrato total de *T. gondii* (estímulo específico), com 5 µg/mL concavalina A (ConA – estímulo inespecífico) e sem estimulo (basal) e mantidas em estufa com 5% de CO_2 á 37 °C por 72 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 8 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise das citocinas. Para a análise das citocinas foi utilizado um kit comercial *Cytometric Bead Array*® Th1, Th2 e Th17 (CBA BD Biosciences), o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após o preparo das amostras foi feita a análise no citômetro de fluxo LSRFortessa® (BD Biosciences). Os dados foram coletados em BD FACSDIVA® (BD Biosciences®) software e analisados em FCAPArray V 3.0® (BD Biosciences) software.

4.13 Análise estatística

A comparação entre valores quantitativos, como quantidade de anticorpos, número absoluto de células, MFI (média da intensidade da fluorescência) e carga parasitária no cérebro foram realizadas pelo teste de ANOVA, verificando-se a homogeneidade de variâncias. Foram consideradas significantes as comparações cuja probabilidade de igualdade for menor que 5% ($p<0.05$). 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 Proteção imunológica dos camundongos BALB/c imunizados por v.o. e por via i.p. com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados a 255Gy de Cobalto 60, após desafio com diferentes cepas cistogênicas

Para avaliar a proteção imunológica induzida pela imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, os camundongos BALB/c imunizados por v.o. e por via i.p., com três doses do imunógeno quinzenalmente, foram desafiados 90 dias após a última dose, com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* (figura 11 A) ou com 10 cistos da cepa VEG de *T. gondii* (figura 11 B) por v.o., camundongos controles foram desafiados no mesmo período. Após 30 dias do desafio os animais foram sacrificados e o cérebro removido para análise da quantificação absoluta de parasita por *real time* PCR. Observamos que ambos os desafios, com a cepa ME-49 e com a cepa VEG, os animais imunizados por via i.p. e por v.o. apresentaram uma diminuição significativa de parasitas no tecido cerebral quando comparados com os camundongos sem imunização.

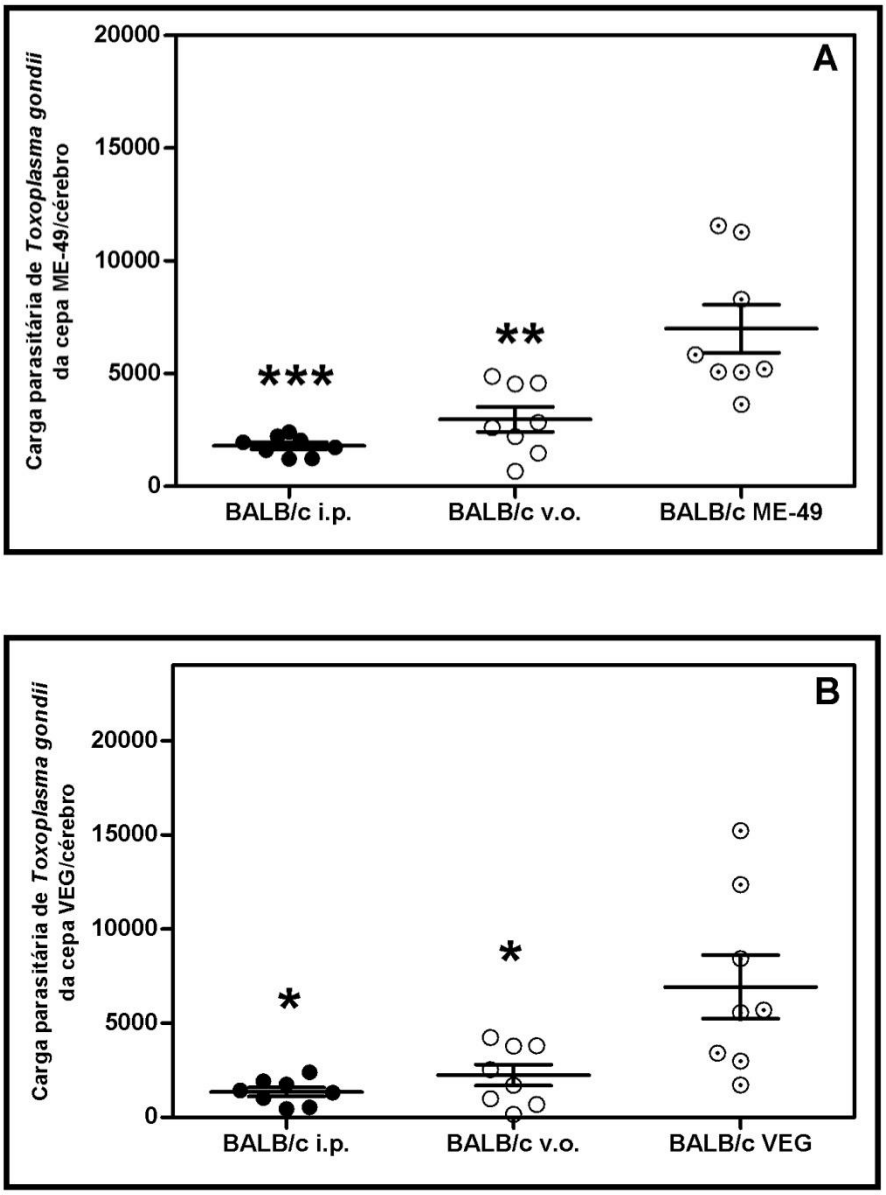


Figura 11: Quantificação absoluta de parasitas de *Toxoplasma gondii* por *real time* PCR, em tecido cerebral de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto60 por via i.p. ou v.o. desafiados com 10 cistos da cepa ME-49 (A) ou cepa VEG (B) por v.o. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa ME-49 sem imunização (A); BALB/c VEG - Camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa VEG sem imunização (B).

5.2 Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c imunizados por via i.p. e por v.o. com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60

Para verificar a resposta imune humoral induzida pela imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, analisamos a produção dos anticorpos IgG, IgA e IgM específicos no soro dos animais imunizados por ELISA. Para verificar afinidade desses anticorpos com o antígeno, foi realizado um ensaio imunoenzimático com adição de um agente caotrópico, determinando ELISA de avidez, as diferenças dos procedimentos foram descritos em métodos.

5.2.1 Anticorpos IgG total e IgG de alta afinidade anti-T. gondii

Na figura 12 observamos a produção de anticorpos específicos IgG total e IgG de alta afinidade no soro dos animais imunizados após 45 e 120 dias da imunização e animais cronicamente infectados. Camundongos BALB/c imunizados por via i.p. apresentaram maiores níveis significativos de anticorpos específicos IgG total quando comparamos com os animais controle. Camundongos BALB/c imunizados por v.o. apresentaram menores níveis de produção de anticorpos específicos IgG total em relação a animais imunizados por via i.p., porém essa produção de anticorpos foi significante em relação ao grupo controle (figura 12A). Camundongos cronicamente infectados também apresentaram maiores níveis significativos de anticorpos específicos IgG total no soro. Observamos que os anticorpos IgG específicos induzidos pela imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados apresentaram alta afinidade com o antígeno, podendo observar o aumento significativo desses anticorpos no soro dos camundongos imunizados por via i.p. e nos animais cronicamente infectados (figura 12A).

Para analisar se resposta imune humoral induzida pela imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados é mantida por períodos mais longos, verificamos a produção dos anticorpos IgG específicos séricos por ELISA após 120 dias da imunização, e para verificar afinidade desses anticorpos com o antígeno, foi realizado um ELISA de avidez no mesmo período. Camundongos BALB/c imunizados por via i.p. e camundongos cronicamente infectados apresentaram um aumento significativo de anticorpos específicos IgG total em relação ao grupo de

controle após 120 dias da imunização (figura 12B), já os camundongos imunizados por v.o. não mostraram produção significativa de anticorpos IgG séricos após esse período. A imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados induziu uma resposta imune humoral duradoura com produção de anticorpos específicos IgG de alta afinidade após 120 dias da imunização, essa resposta pode ser observada nos camundongos imunizados por via i.p. com o aumento significativo de anticorpos IgG de alta afinidade quando comparamos com o grupo sem imunização. Camundongos cronicamente infectados também apresentaram o aumento significativo de anticorpos IgG de alta afinidade (figura 12B).

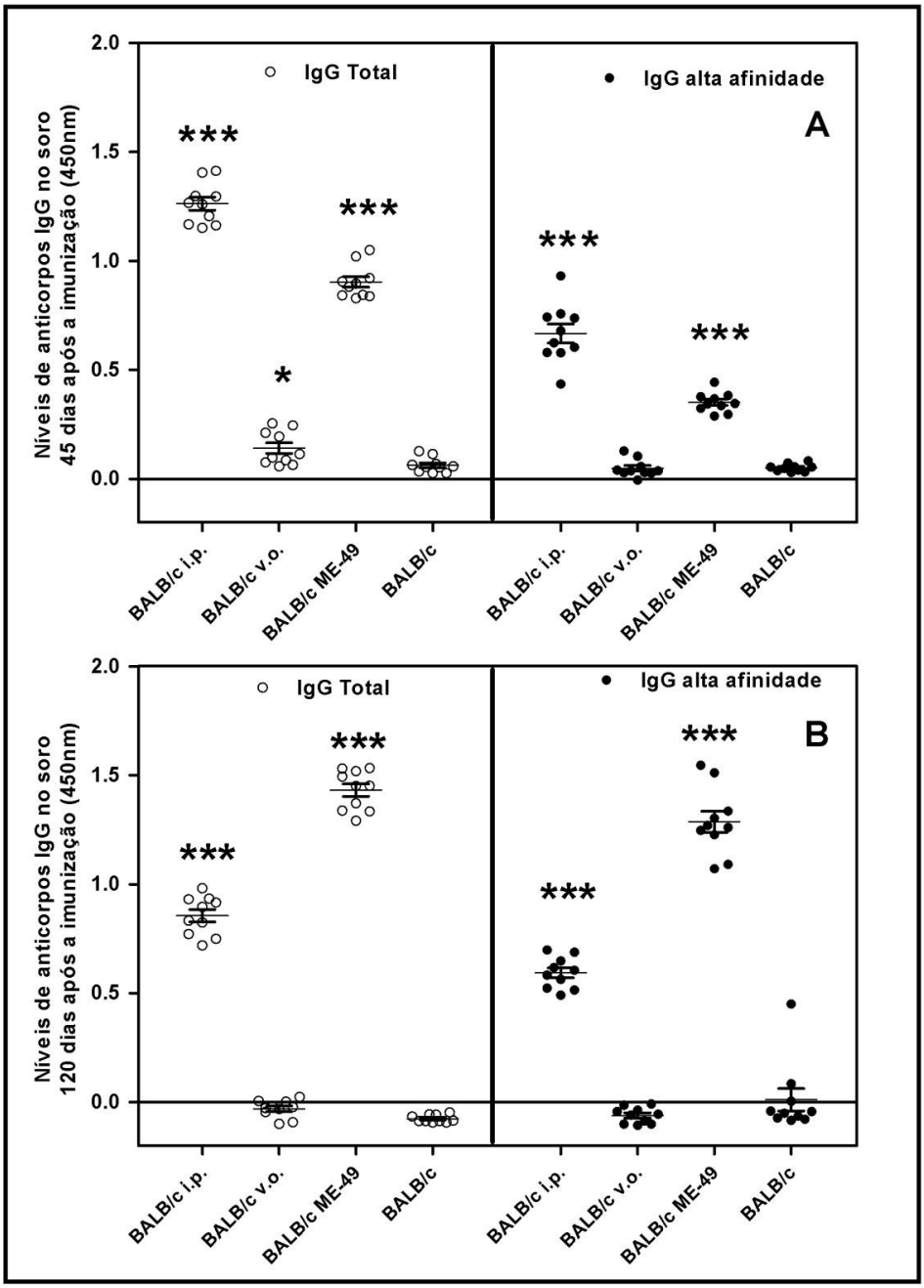


Figura 12: Detecção de anticorpos IgG total anti-*T.gondii* (círculos abertos) e anticorpos IgG de alta avidez anti-*T.gondii* (círculos fechados) em soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 45 dias e 120 dias (B) da imunização. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (**p<0,01; ***p<0,001) significante quanto ao grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.2.2 Anticorpos IgA total e IgA de alta afinidade anti-T. gondii

Na figura 13 observarmos a produção de anticorpos específicos IgA total e IgA de alta afinidade no soro dos animais imunizados após 45 dias da imunização e em camundongos com infecção crônica. Observamos também que os camundongos imunizados por ambas as vias de inóculo apresentaram maiores níveis significativos de anticorpos IgA total anti-*T. gondii* no soro quando comparamos com os animais controle. Os animais que receberam a imunização por via i.p. apresentaram menores níveis de anticorpos específicos IgA no soro em relação ao grupo que recebeu o imunógeno por v.o.. Camundongos cronicamente infectados também apresentaram níveis significativos de anticorpos específicos IgA séricos (figura 13). Também é possível notar que os animais que receberam o imunógeno por v.o. e animais infectados com a cepa ME-49 apresentaram um aumento de anticorpos específicos IgA de alta afinidade com o antígeno em relação ao grupo controle (figura 13).

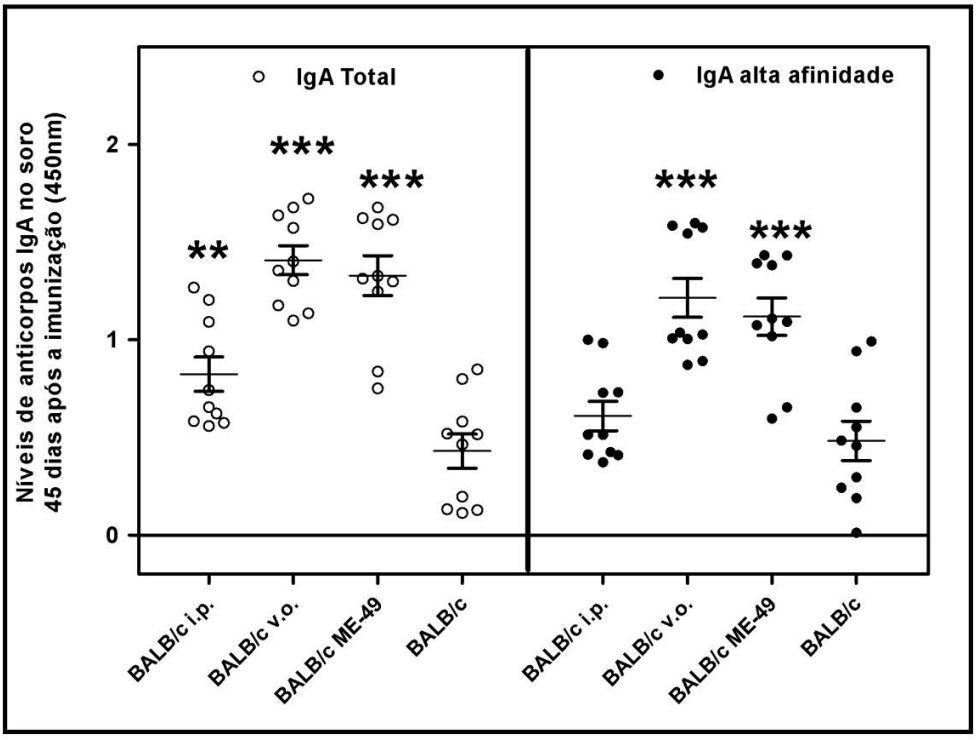


Figura 13: Detecção de anticorpos IgA total anti-*T.gondii* (círculos abertos) e anticorpos IgA de alta avidez anti-*T.gondii* (círculos fechados) em soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 45 dias da imunização. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (**p<0,01; ***p<0,001) significante quanto ao grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.2.3 Anticorpos IgM total e IgM de alta afinidade anti-T. gondii

A produção de anticorpos específicos IgM total e IgM de alta afinidade no soro dos animais imunizados, após 45 dias de imunização, e animais com infecção crônica pode ser observada na figura 14. Camundongos BALB/c imunizados por via i.p. e por v.o. e camundongos cronicamente infectados apresentaram maiores níveis significativos de anticorpos IgM total anti-*T. gondii* quando comparamos com os animais controle. Camundongos que receberam o imunógeno por via i.p. apresentaram um aumento significativo na produção de anticorpos IgM específicos de alta afinidade (figura 14).

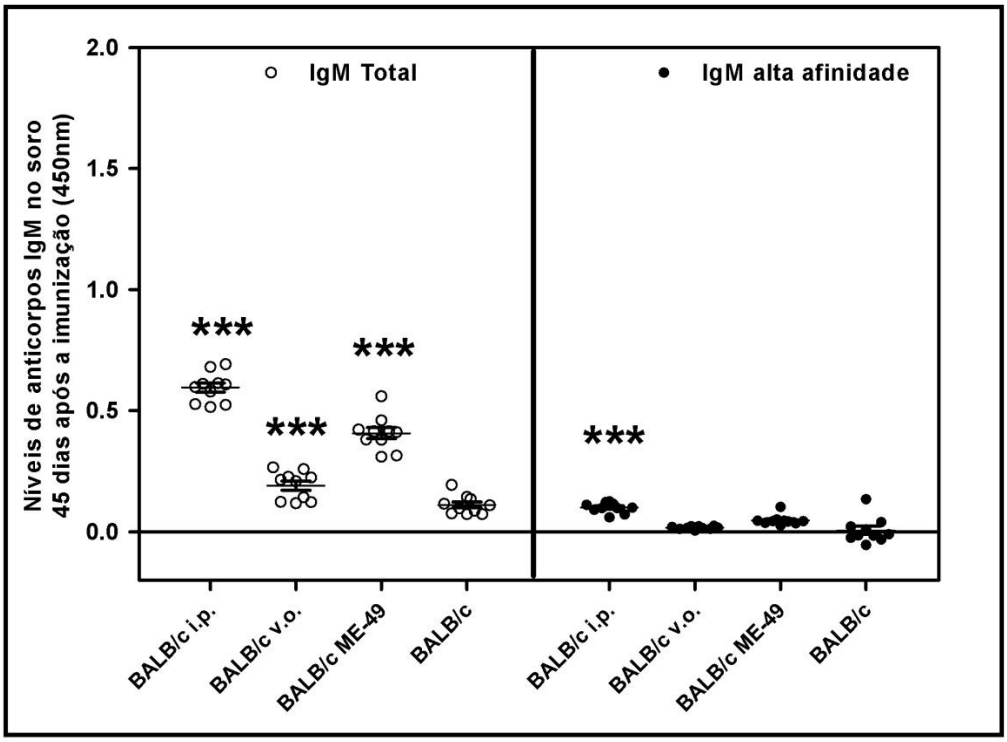


Figura 14: Detecção de anticorpos IgM total anti-*T.gondii* (círculos abertos) e anticorpos IgM de alta avidez anti-*T.gondii* (círculos fechados) em soro dos animais imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 15 dias da imunização. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (***p<0,001) significante quanto ao grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

Camundongos que receberam o imunógeno por via i.p. apresentaram uma forte resposta imune humoral com aumento de anticorpos séricos principalmente da classe IgG, esses anticorpos específicos também apresentavam uma alta afinidade com antígeno. Esses animais imunizados por via i.p. também mostraram um aumento da resposta de IgA e IgM sérica. Já os camundongos imunizados por v.o. apresentaram uma maior resposta de IgA sérica e maior avidez nessa classe de anticorpo.

A reposta imune humoral específica induzida pela imunização foi correlacionada com os níveis de proteção após o desafio com a cepa Me-49 de *T. gondii*. As correlações entre a produção de IgG total (r=-0,6505) e IgG de alta afinidade (r=-0,7356) apresentaram uma relação negativa significativa com a infecção por ME-49 (p=0,0417; p=-0,7356, respectivamente), portanto, a maior produção de anticorpos IgG específicos favorece a diminuição da infecção, logo,

animais imunizados por via i.p. apresentam menor carga parasitária. Já a correlação de IgA total (r=0,7112) e IgA de alta afinidade (r=0,7234) apresentaram uma relação positiva significativa com a infecção por ME-49 (p=0,0211 e p=0,0180, respectivamente), ou seja, quanto maior o nível de IgA maior a infecção, isso mostra que animais imunizados por v.o. apresentam maiores níveis de infecção. Os anticorpos IgM de alta afinidade apresentaram uma correlação negativa (r=-0,7964) altamente significativa (p=0,0058) com a infecção ME-49, assim, quanto maior o nível de IgM específicos de alta afinidade menor a infecção (Apêndice A).

5.3 Perfil imunológico dos camundongos BALB/c imunizados por via i.p. e por v.o. com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60

Para verificar as mudanças imunológicas induzidas por imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiado analisamos por citometria de fluxo os linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), linfócitos B ($CD19^+$) e plasmócitos ($CD138^+$) do baço e do sangue periférico dos camundongos imunizados. Para avaliar linfócitos T utilizamos marcadores de superfície específica, como anticorpos anti-CD3, anticorpos anti-CD4 para linfócitos T *helper,* anticorpos anti-CD8 para linfócitos T citotóxicos, anticorpos anti-CD19 para linfócitos B e anticorpos anti-CD138 para os plasmócitos. Para uma melhor análise, optamos por apresentar os resultados do baço em número absoluto de célula, e para os resultados do sangue periférico optamos por proporção da população. O cálculo do número absoluto e a estratégia de análise para cada população celular são descritos em métodos.

Para avaliar a ativação celular na população de linfócitos TCD4 e TCD8 do baço e do sangue periférico dos camundongos imunizados por via i.p. e por v.o., analisamos por citometria de fluxo os linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ juntamente com marcadores de superfície específica, como anticorpos anti-CD44, anti-CD45RB e anti-CD69, e para a ativação celular dos linfócitos B analisamos $CD19^+$ juntamente com anticorpos anti-CD23 e anti-CD69. Para uma melhor análise, essas populações celulares foram expressas em MFI (média da intensidade da fluorescência), e a estratégia da análise para cada população celular foi descrita em métodos.

Para verificarmos o número absoluto, a proporção e a ativação celular, em todos os experimentos de citometria de fluxo foram utilizados 3 animais de cada grupo, sendo realizados 3 experimentos executados com o mesmo procedimento.

5.3.1 Proporção e ativação celular de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) no sangue

Na figura 15 observamos a proporção de linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$) no sangue periférico dos camundongos imunizados. Notamos que houve um aumento significativo da população de linfócitos TCD4 ($CD3^+CD4^+$) nos animais imunizados por v.o. em comparação com a população celular dos animais sem imunização, também podemos notar que camundongos imunizados por i.p. apresentaram um aumento dessas células no sangue periférico, porém essa proporção não foi significante (figura 15).

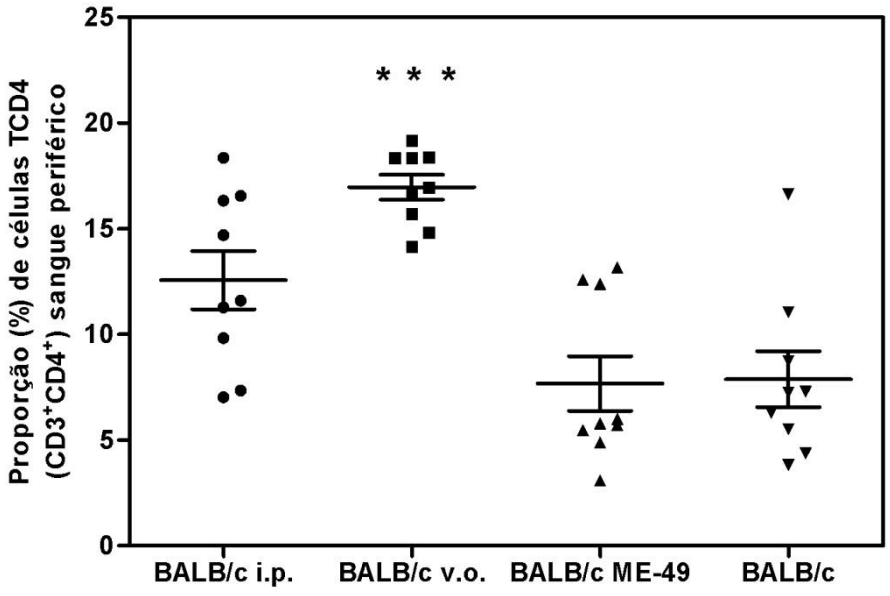


Figura 15: Proporção (%) de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

Na figura 16 observamos ativação celular em linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$) do sangue periférico. Podemos observar um aumento significante da expressão de CD44 nessas células nos animais cronicamente infectados em relação ao grupo sem infecção (figura 16A). Quando observarmos a expressão de CD45RB nos linfócitos TCD4 do sangue periférico, não há diferença significativa em nenhum dos grupos imunizados (figura 16B). Notamos um aumento significativo da expressão de CD69 em linfócitos TCD4 de camundongos imunizados por via i.p. e cronicamente infectados quando comparamos com o grupo de camundongos controles e com os animais imunizados por v.o. (Figura 16C).

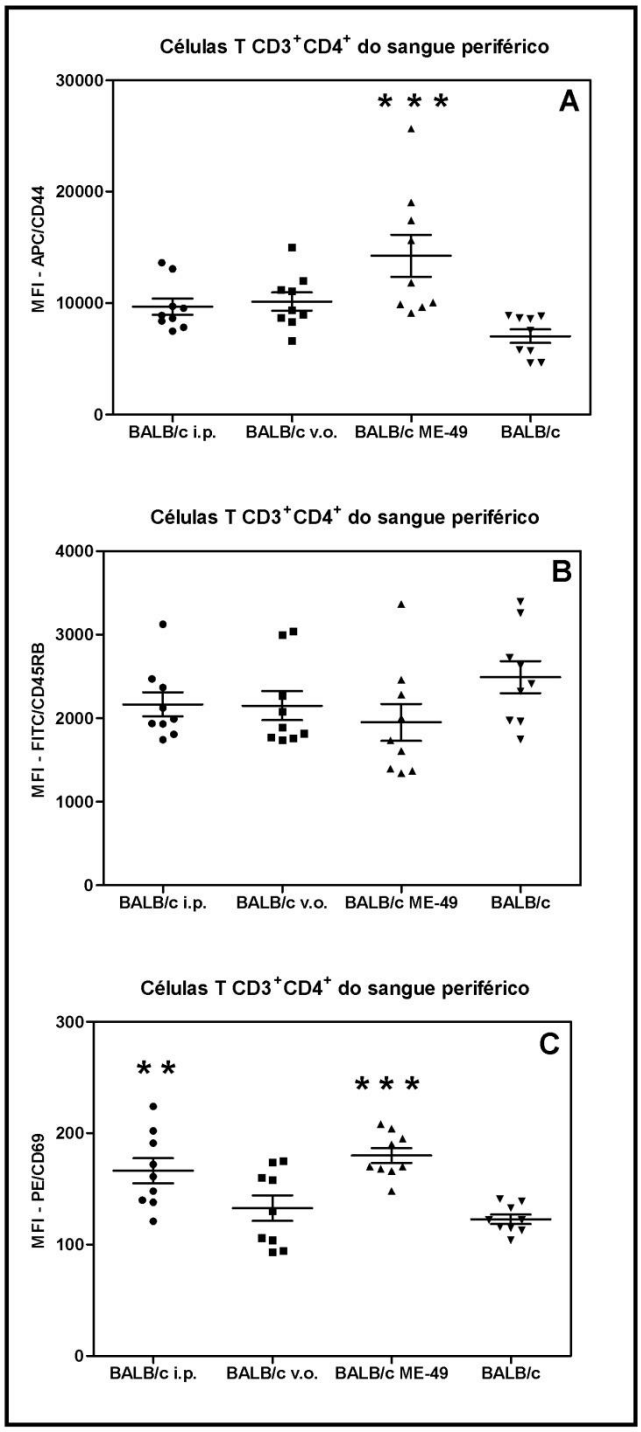


Figura 16: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (**p<0,01; ***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.3.2 Número absoluto e ativação celular de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) no baço

Na figura 17, percebemos o número absoluto de linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$) no baço de camundongos imunizados por via i.p. e por v.o. com taquizoítos de *T. gondii* irradiados. Podemos notar um aumento significante da população de linfócitos TCD4 ($CD3^+CD4^+$) esplênicos nos animais que receberam o imunógeno por via i.p. e nos animais cronicamente infectados com a cepa ME-49, em relação ao grupo controle (figura 17).

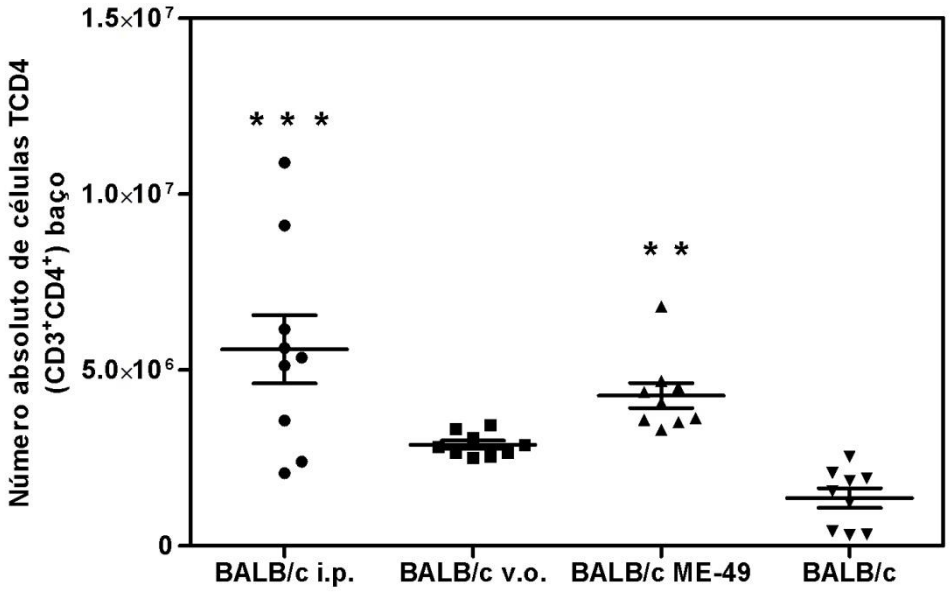


Figura 17: Número absoluto de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (**p<0,01; ***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

Podemos observar na figura 18 a ativação celular em linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$) esplênicos dos animais imunizados, notamos também que a expressão de CD44 nos linfócitos TCD4 não foi significante em nenhum dos grupos imunizados (figura 18A), já a expressão de CD45RB nessas células mostrou uma diminuição significante nos grupos de imunização e também nos animais cronicamente infectados com a cepa ME-49, em relação ao grupo sem imunização e sem infecção (figura 18B). Podemos perceber que houve um aumento significativo da expressão

de CD69 em linfócitos TCD4 esplênicos de camundongos imunizados por ambas as vias de imunização e camundongos cronicamente infectados quando comparamos com o grupo de camundongos controles (Figura 18C).

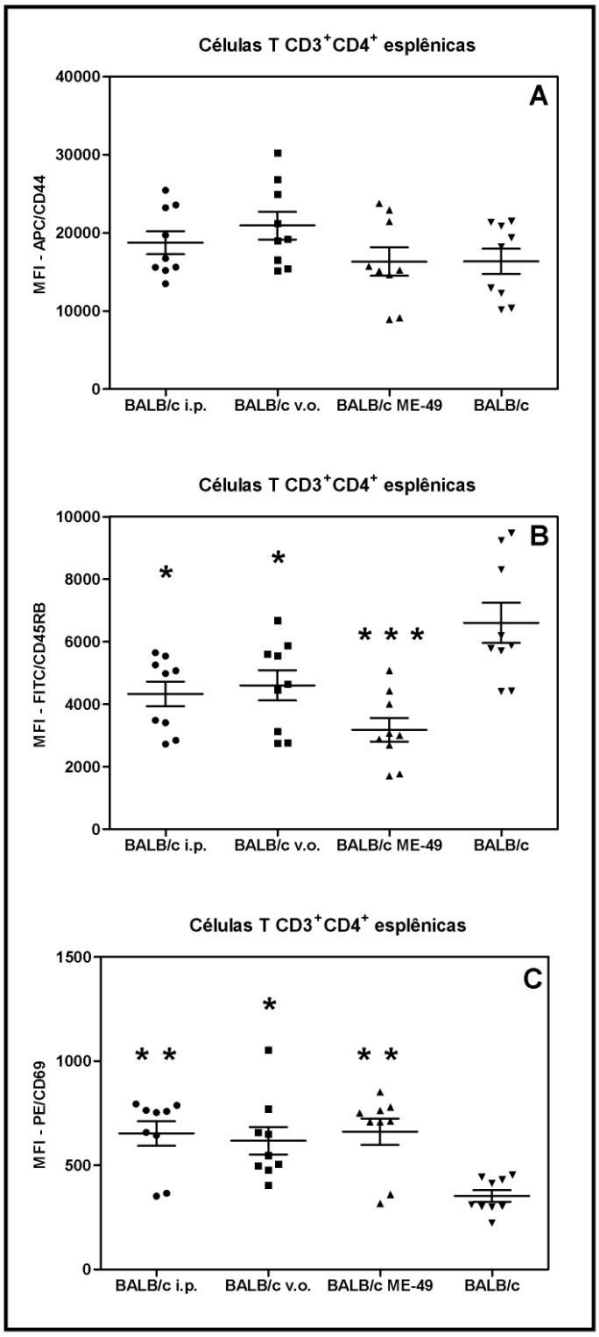


Figura 18: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T helper ($CD3^+CD4^+$) esplênicos de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*p<0.05; **p<0,01; ***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.3.3 Proporção e ativação celular de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) no sangue

Na figura 19 observamos a proporção de linfócitos TCD8 no sangue periférico, e podemos notar o aumento significante dessa população ($CD3^+CD8^+$) nos animais imunizados por ambas as vias de imunização e nos animais cronicamente infectados com a cepa ME-49, em relação ao grupo controle (figura 19).

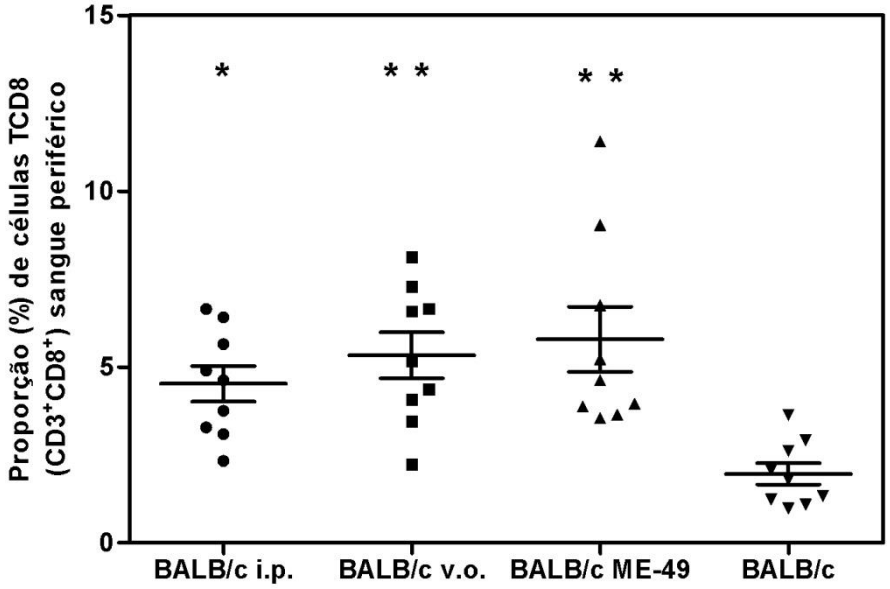


Figura 19: Proporção de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*p<0.05; **p<0,01) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

Na figura 20 observamos ativação celular em linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) do sangue periférico. Camundongos cronicamente infectados apresentaram um aumento significante da expressão de CD44 nos linfócitos TCD8 em relação ao grupo sem infecção (figura 20A). Animais imunizados por via i.p. e animais cronicamente infectados mostraram uma diminuição significante da expressão de CD45RB nos linfócitos TCD8 do sangue periférico ao serem comparados com a expressão dessa proteína nos linfócitos TCD8 dos animais controle (figura 20B). Podemos observar que a expressão de CD69 nessa população celular não apresentou diferença significativa entre os grupos imunizados (Figura 20C).

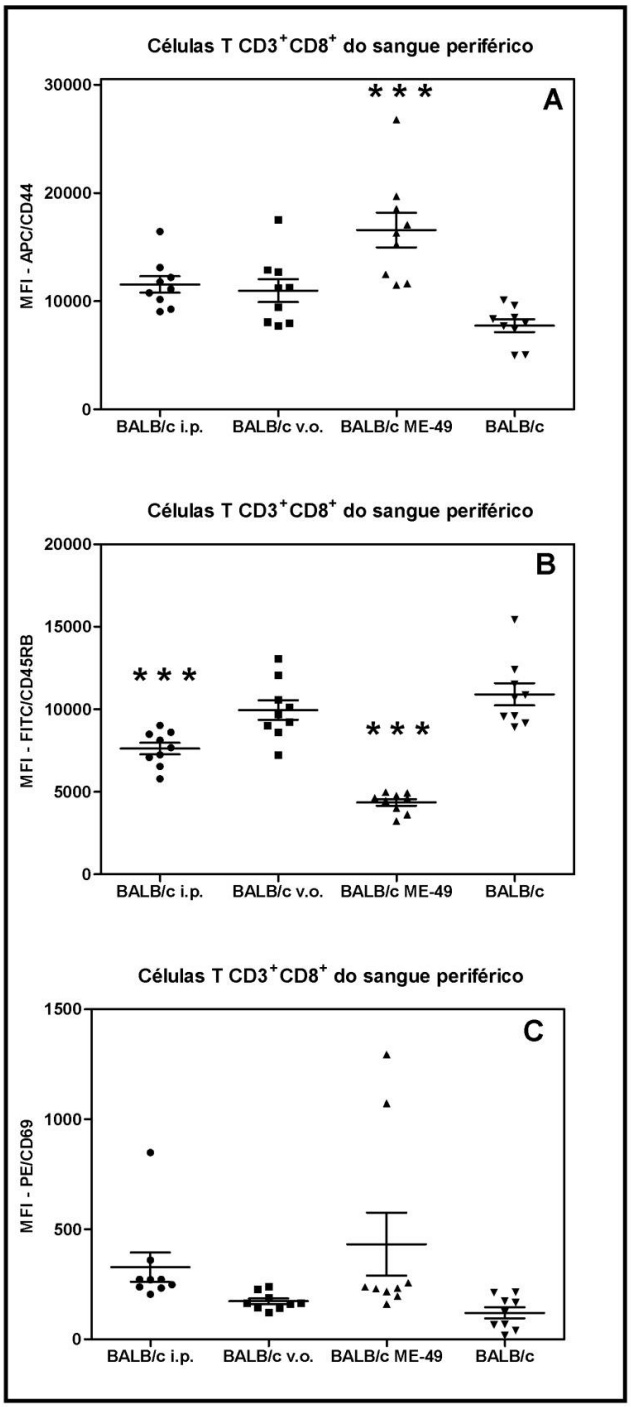


Figura 20: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.3.4 Número absoluto e ativação celular de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) no baço

Observarmos na figura 21 que camundongos imunizados por ambas as vias de inóculo apresentaram um aumento significativo da população de linfócitos T CD8 ($CD3^+CD8^+$) esplênicos quando comparamos com a população dessas células dos animais sem imunização e sem infecção. Animais cronicamente infectados com a cepa ME-49 também apresentaram um aumento significativo da população de linfócitos TCD8 (Figura 21).

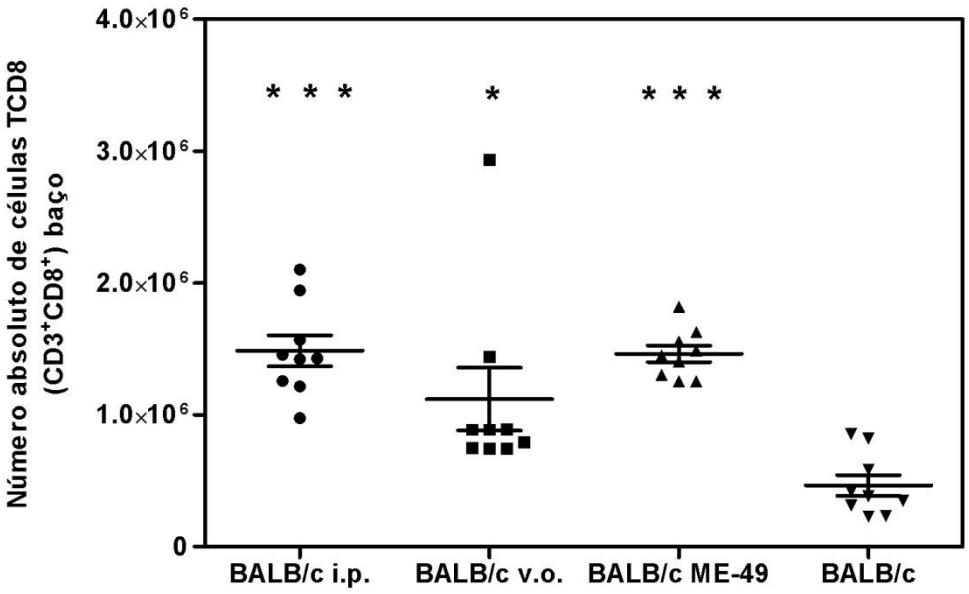


Figura 21: Número absoluto de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*p<0.05; ***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

A ativação celular da população de linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+) esplênicos é observada na figura 22, notamos que a expressão de CD44 nessa população celular não apresentou significância em nenhum dos grupos imunizados em relação ao grupo controle (Figura 22A). A expressão de CD45RB em linfócitos TCD8 do baço mostrou uma significância somente nos grupos infectados, entretanto podemos observar uma diminuição da expressão dessa proteína na superfície

celular dos linfócitos TCD8 em ambos os grupos de imunização (figura 22B). Já a expressão de CD69 nessas células mostrou um aumento significante nos animais que receberam o imunógeno por via i.p., apesar da população de linfócitos TCD8 esplênicos dos animais que receberam o imunógeno por v.o. não apresentaram significância, dessa maneira, notamos um aumento da expressão de CD69 nessa população celular (figura 22C).

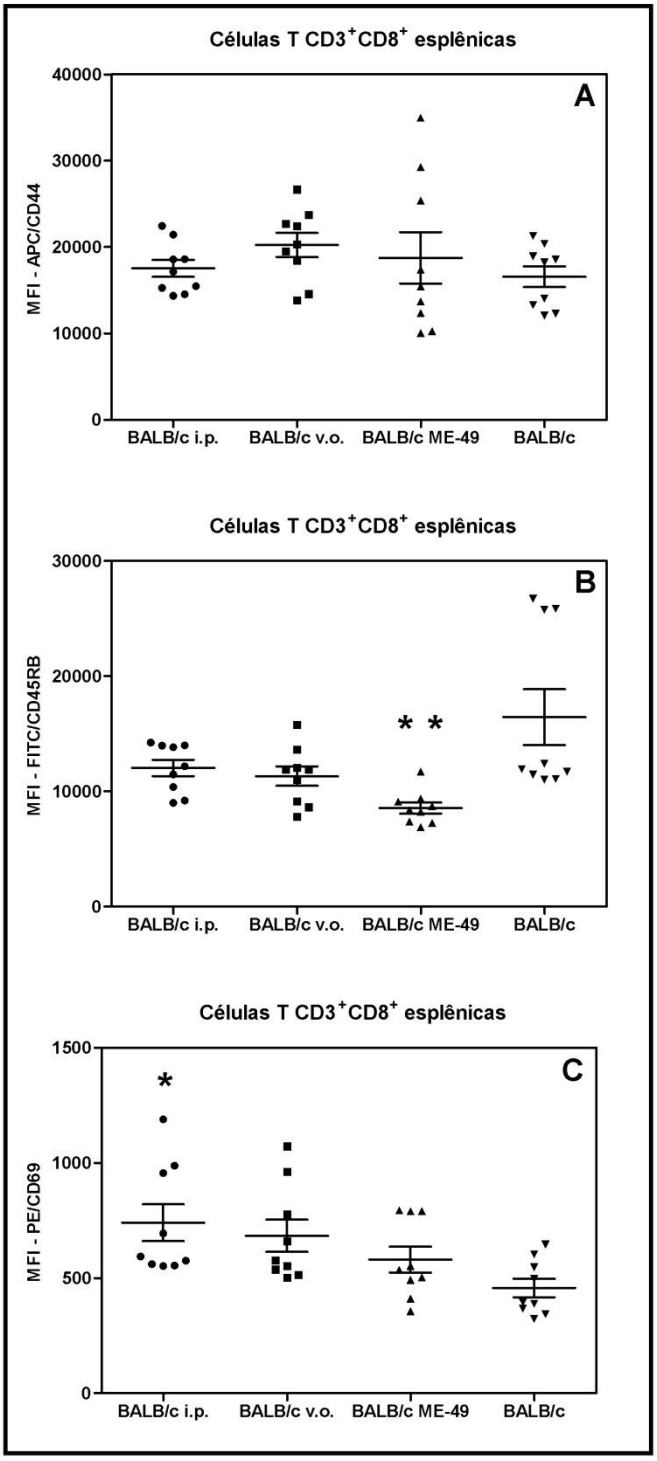


Figura 22: MFI APC/CD44 (A); FITC/CD45RB (B); PE/CD69 (C) da população de linfócitos T citotóxico ($CD3^+CD8^+$) esplênicos de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*p<0.05; **p<0,01) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.3.5 Proporção e ativação celular de linfócitos B (CD19⁺) do sangue periférico

Observamos na figura 23 a população de linfócitos B ($CD19^+$) do sangue periférico, notamos o aumento significativo da população de linfócitos B $CD19^+$ do sangue periférico dos animais imunizados por v.o. com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, quando comparamos com a população de linfócitos B dos animais sem imunização e sem infecção (Figura 23).

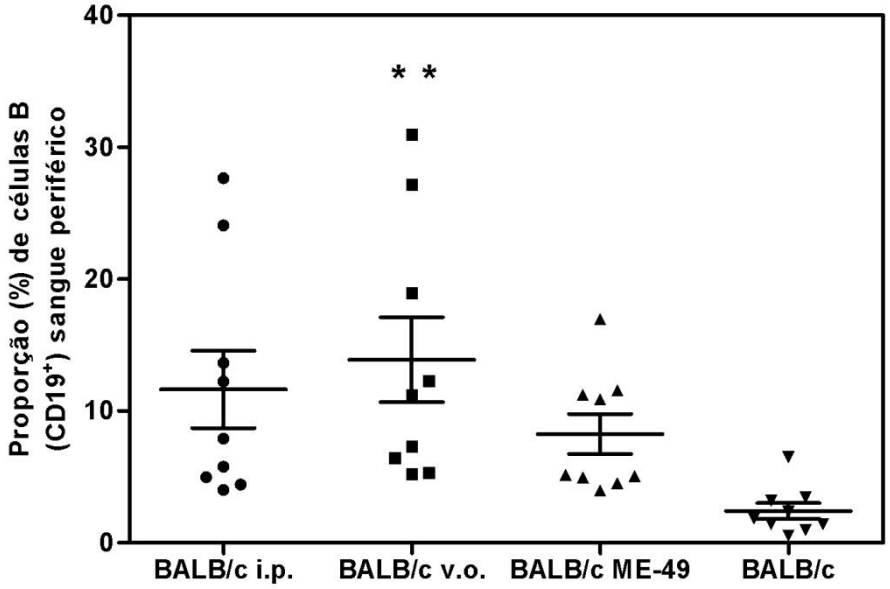


Figura 23: Proporção de linfócitos B ($CD19^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

Na figura 24 podemos observar o aumento da expressão de CD23 nos linfócitos B do sangue periférico dos animais imunizados por ambas as vias de inóculo, porém os resultados não foram significantes (figura 24A). Os linfócitos B do sangue periférico dos animais infectados apresentaram um aumento significativo da expressão de CD69 ao compararmos com expressão dessa proteína nos linfócitos B dos animais sem infecção (figura 24B).

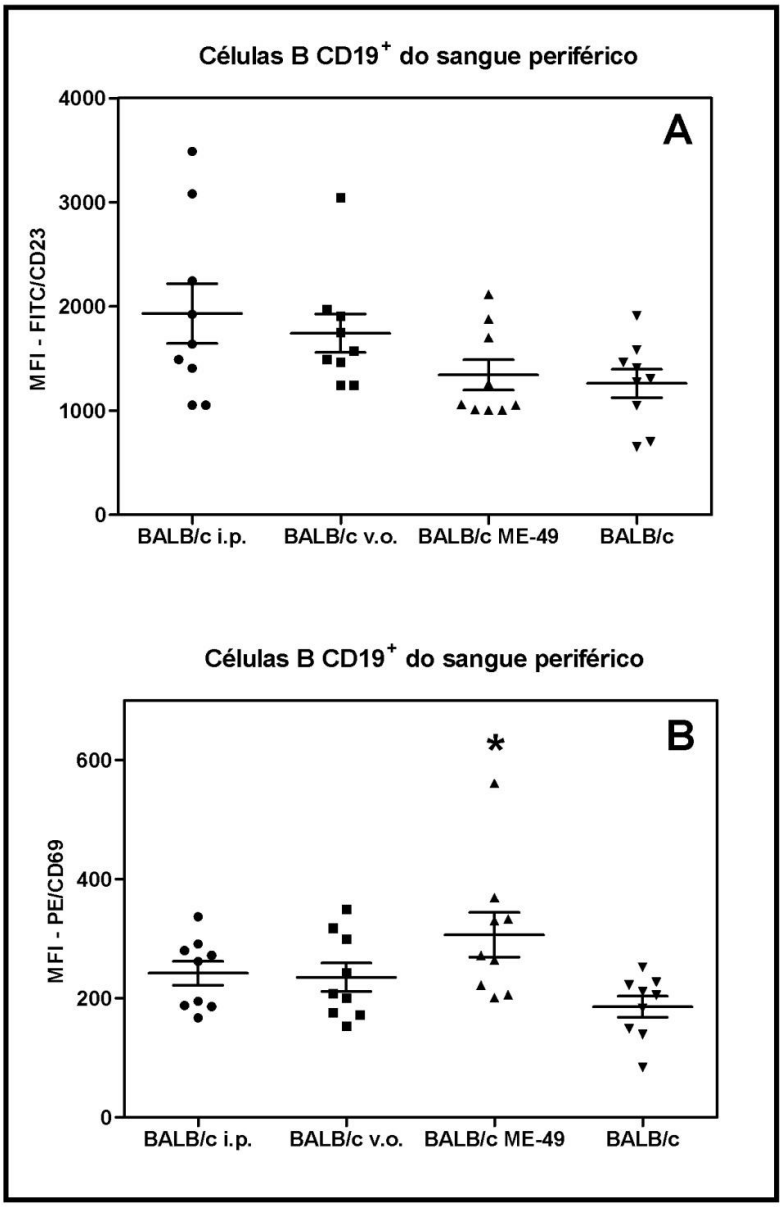


Figura 24: MFI FITC/CD23 (A); PE/CD69 (B) da população de linfócitos B ($CD19^+$) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*p<0,05) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.3.6 Número absoluto e ativação celular de linfócitos B ($CD19^+$) do baço

Na figura 25 observamos o número absoluto de linfócitos B ($CD19^+$) no baço de camundongos imunizados e controles. Houve um aumento significativo da população de linfócitos B $CD19^+$ esplênicos nos animais imunizados por ambas as

vias de inóculo e nos animais cronicamente infectados em comparação aos animais sem imunização e sem infecção (Figura 25).

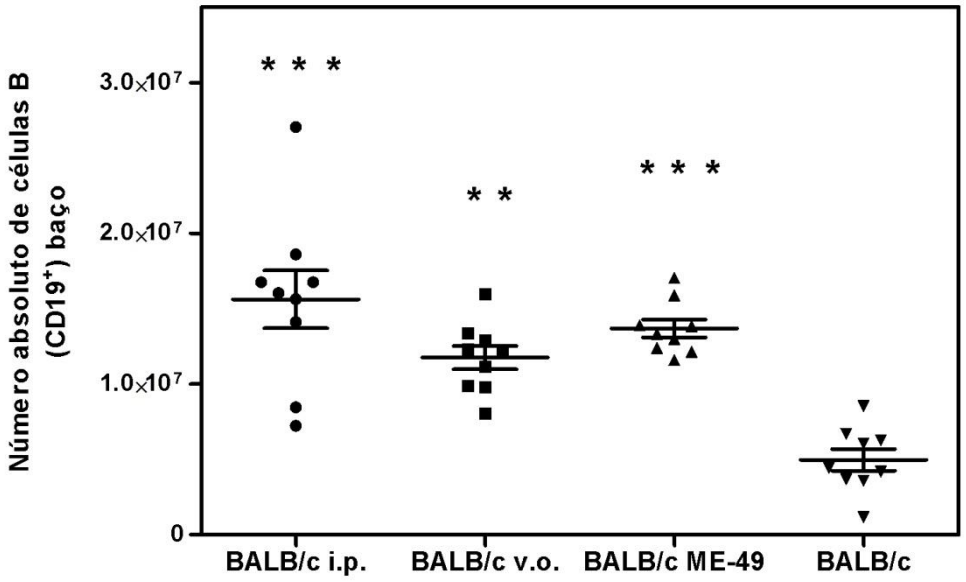


Figura 25: Número absoluto de linfócitos B – $CD19^+$ de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (**p<0,01; ***p<0,001) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

Observamos a ativação celular da população de linfócitos B ($CD19^+$) esplênicos na figura 26. Não houve diferença significativa em nenhum grupo imunizado quando analisamos a expressão de CD23 nos linfócitos B, porém observarmos um aumento da expressão dessa proteína nas células esplênicas dos camundongos imunizados, tanto por via i.p. como por v.o. quando comparamos com os animais controle (Figura 26A). Os linfócitos B esplênicos de camundongos que receberam o imunógeno por via i.p. apresentaram um aumento significativo da expressão de CD69 ao serem comparados com a expressão de CD69 nos linfócitos B dos animais sem imunização e sem infecção (Figura 26B). Quando observamos o aumento da expressão de CD69, nos linfócitos B dos animais que receberam a imunização por v.o., apesar dos valores não serem significativos, apresentou um aumento em relação ao grupo controle (figura 26B).

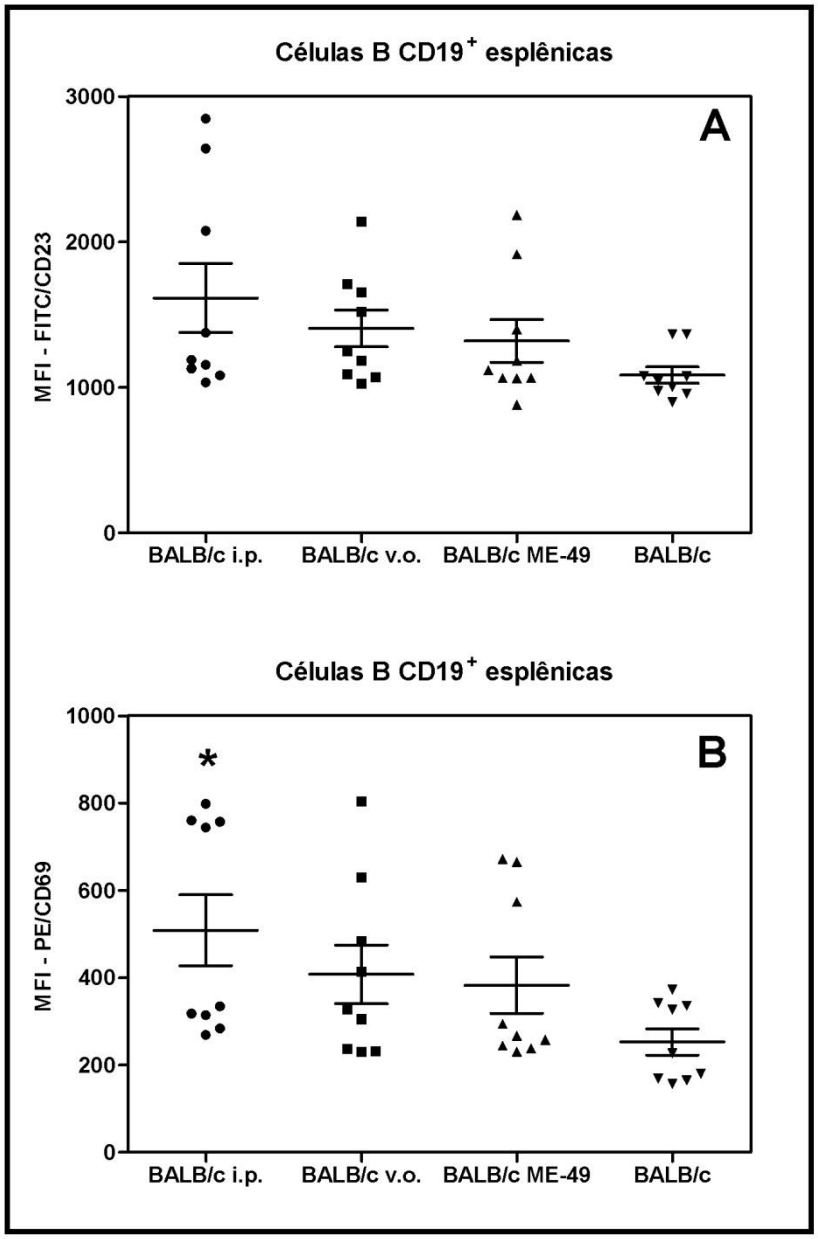


Figura 26: MFI FITC/CD23 (A); PE/CD69 (B) da população de linfócitos B ($CD19^+$) esplênicos de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*$p<0,05$) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.3.7 Proporção de plasmócitos (CD138⁺) do sangue periférico

Observarmos a proporção de plasmócitos no sangue periférico na figura 27, e notamos o aumento significativo dessa população celular (CD138⁺) somente em animais que receberam a imunização por v.o., enquanto os animais imunizados por via i.p. ou infectados mantiveram proporção semelhante aos controles sadios.

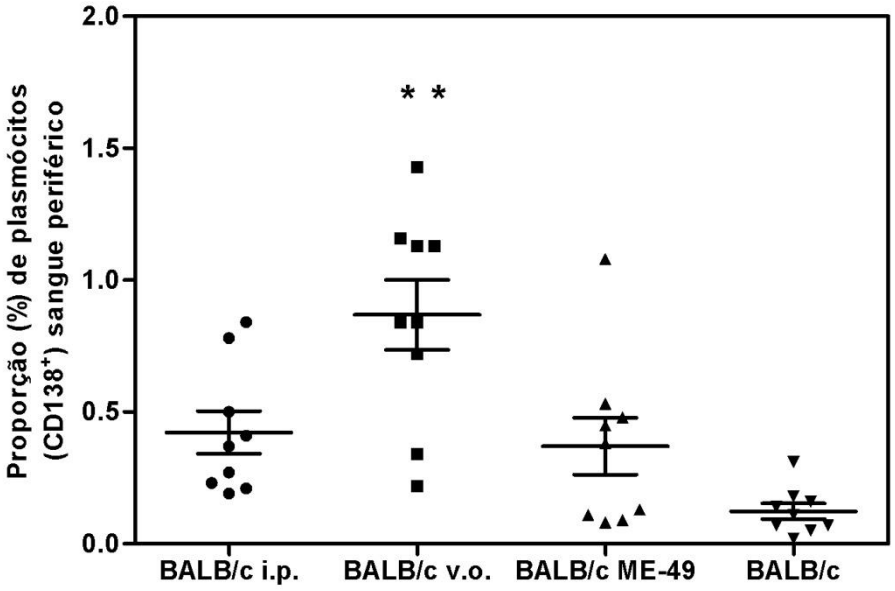


Figura 27: Proporção de plasmócitos (CD138⁺) do sangue periférico de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (**p<0,01) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

5.3.8 Número absoluto de plasmócitos (CD138⁺) do baço

A população de plasmócitos do baço dos animais imunizados por via i.p. ou por v.o. e cronicamente infectados é representada na figura 28. A população de plasmócitos (CD138⁺) do baço aumentou de forma significante nos animais imunizados por via i.p. ou infectados, mas não nos animais imunizados por v.o.

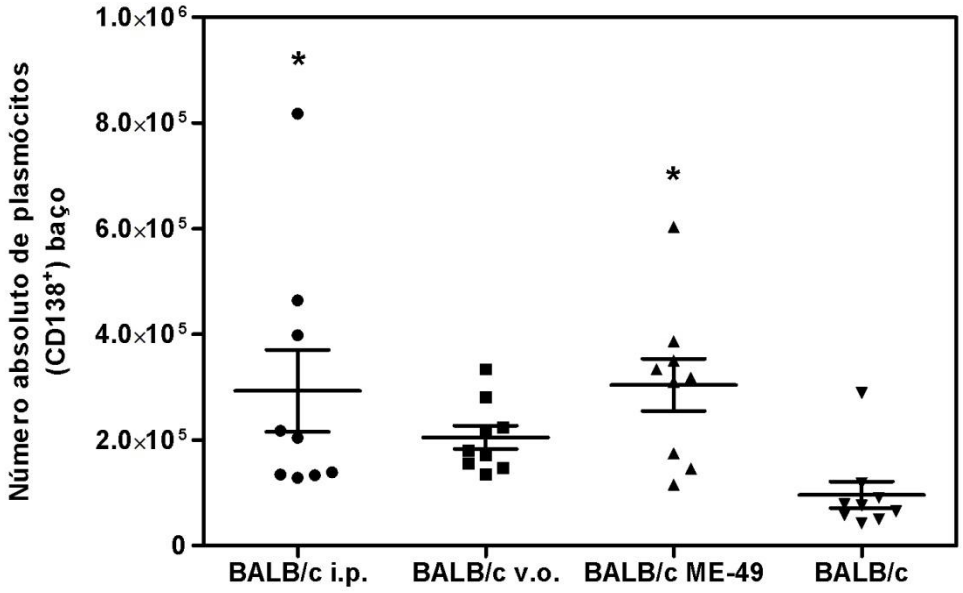


Figura 28: Número absoluto de plasmócitos (CD138$^+$) de baço de camundongos BALB/c imunizados com 10^7 de taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. ou v.o.. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença do asterisco indica diferença (*p<0.05) significante entre o grupo controle. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

Camundongos imunizados por via i.p. apresentaram uma maior população de linfócitos TCD8$^+$ no baço, já os animais que receberam o imunógeno por v.o. mostraram um aumento dessa população no sangue periférico. Essas células foram correlacionadas com os níveis de proteção após desafio com a cepa ME-49 de *T. gondii*. O valor da estimativa do coeficiente de Spearman (r) entre as células TCD8$^+$ do baço e a infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii* é -0,6606 e a correlação é significativa (p=0,0376). Podemos inferir que há uma correlação negativa e significativa entre a população de células TCD8 com a infecção, ou seja, quando há um número maior de células TCD8, menor a infecção. Podemos notar também que há uma correlação negativa significativa na população de células TCD8$^+$ no sangue periférico (r= -0,6727; p=0,0330) (Apêndice A). Essas células podem estar associadas com a diminuição de cistos teciduais nos animais imunizados tanto por via i.p. como por v.o.

5.4 Células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados por v.o. e por via i.p. com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados a 255Gy de Cobalto 60 responsivas ao antígeno

5.4.1 Proliferação celular de células B, TCD4$^+$ e TCD8$^+$ por ensaio de CFSE

Para verificar células B, células TCD4$^+$ e TCD8$^+$ responsivas ao antígeno de *T. gondii*, foi analisada por citometria de fluxo a proliferação celular juntamente com a fenotipagem celular. Após 45 dias da imunização, dois animais de cada grupo foram sacrificados e os baços foram removidos de maneira estéril para dissociar as células. Após a purificação, as células do baço foram submetidas à marcação com CFSE para quantificar a proliferação de células induzidas por estimulação específica durante 6 dias. As células estimuladas com os estímulos não específicos (ConA) responderam com um aumento de 60% na proliferação (figura 29A). Para quantificar a proliferação de cada população, as células foram estimuladas com o antígeno específico (extrato proteico de *T. gondii* - Toxo), e em seguida marcadas com anticorpos específicos para cada tipo celular, como descrito nos Métodos. Houve aumento significativo da proliferação de células TCD4$^+$ (CD4$^+$CD3$^+$) em baços de camundongos infectados ou imunizados por via i.p. em comparação com os animais imunizados por v.o. ou sem imunização (Figura 29C). A proliferação de células TCD8$^+$ (CD3$^+$CD8$^+$) foi em maior proporção somente em baços de animais infectados. (Figura 29D). Além disso, houve aumento da proliferação de células B (CD19$^+$) em baço de animais imunizados por via i.p. (Figura 29E), que não ocorre em animais imunizados por v.o. ou controles sadios.

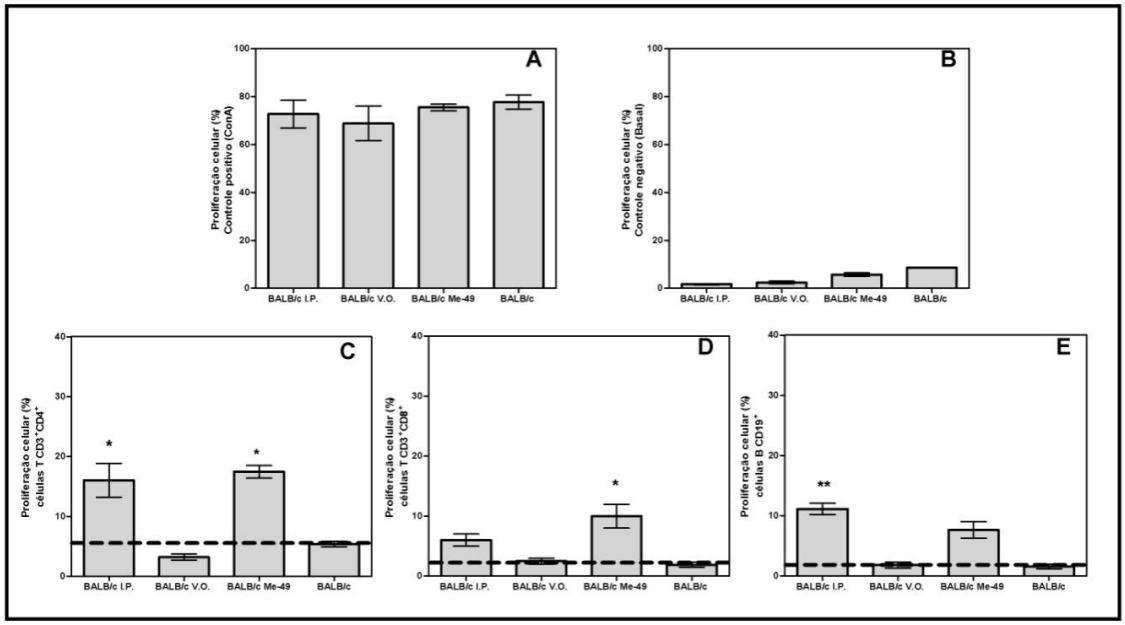


Figura 29: Proliferação celular de células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., após 15 dias da imunização. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (*p<0,05;**p<0,01) significante quanto ao grupo sem imunização. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção. A – Cultura de esplenócitos com estimulo inespecífico (ConA); B – Cultura de esplenócitos sem estímulos (Basal); C (células $TCD4^+$), D (células $TCD8^+$) e E (células B) – Cultura de esplenócitos com estimulo especifico (Antígeno de *T. gondii*).

5.4.2 Produção de citocinas por células esplênicas por ensaio de CBA

Para avaliar a resposta imune celular induzida pela imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados, analisamos a produção de 7 citocinas, como IL-10, IL-17A, IL-6, IL-4, TNF-alfa, IFN-gama e IL-2 por CBA (Cytometric Bead Array) em células esplênicas de 5 animais de cada grupo. A produção dessas citocinas foi analisada em cultura na presença do estímulo específico (extrato proteico de *T. gondii)* (figura 30) ou estímulo inespecífico (ConA) (Apêncie B), além da produção basal em células sem estímulo (basal) (Apêndice C).

Houve uma produção basal de todas as citocinas analisadas e o aumento dessa produção quando estimuladas com ConA, demonstrando a sensibilidade e especificidade da quantificação. Podemos notar que nas células esplênicas dos camundongos imunizados por via i.p. o aumento significativo na produção de

citocinas, como IL-10 (figura 30A), IFN-gama (figura 30D) e IL-4 (figura 30F) após o estímulo com antígeno específico para *T. gondii*. Camundongos cronicamente infectados apresentaram um aumento significativo na produção de citocinas, como TNF-alfa (figura 30C), IFN gama (figura 30D) e IL-6 (figura 30E) por células esplênicas após o estimulo específico.

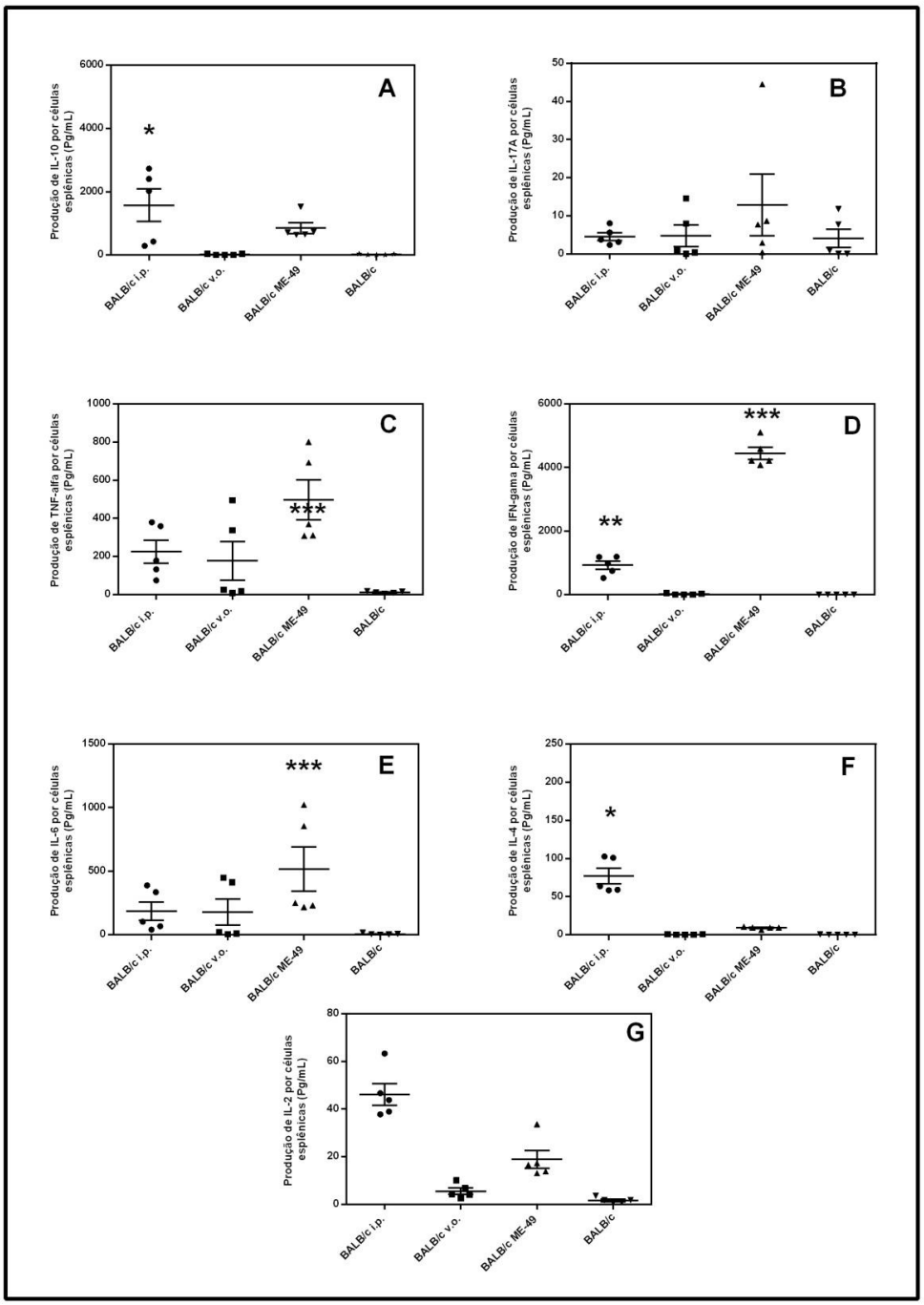


Figura 30: Produção de IL-10 (A), **p**rodução de IL-17-A (B), produção de TNF-alfa (C), produção de IFN-gama (D), produção de IL-6 (E), produção de IL-4 (F) e produção de IL-2 (G) por células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., estimuladas com extrato solúvel de *T.gondii* após 15 dias da imunização. Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (*p<0,05; ***p<0,001) significante quanto ao grupo sem imunização. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

A produção de IL-10 (r=-0,6626) e de IL-4 (r=-0,8432) por células esplênicas apresentaram uma correlação negativa significativa em relação à infecção por ME-49 (p=0,0368 e p=0,0022, respectivamente), portanto, o aumento dessas citocinas pode auxiliar a resposta imune no controle da infecção do hospedeiro após desafio com a cepa ME-49 de *T. gondii* (Apêncie A).

6 DISCUSSÃO

Os nossos dados demonstraram que camundongos BALB/c imunizados por via i.p. ou por v.o. com taquizoítos de *T. gondii* irradiados apresentaram proteção imune após desafio com diferentes cepas de *T. gondii*, avaliada por meio de desafio após 90 dias da última dose. Camundongos imunizados por ambas as vias de inóculo apresentaram altos níveis de proteção tanto com a cepa ME-49 (tipo II) como com a cepa VEG (tipo III) com menor carga parasitária no cérebro. Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que camundongos imunizados com o mesmo modelo vacinal apresentaram altos níveis de proteção tanto quantitativa como qualitativa por meio de desafios com diferentes cepas após 15 dias da última dose (Zorgi et al., 2011). Camundongos imunizados com outros modelos vacinais, como por exemplo, vacina de DNA (SAG5) e desafiados com 20 cistos da cepa PRU de *T. gondii* apresentaram uma redução de cistos no cérebro quando comparados com os controles (Lu et al., 2015). A maioria dos trabalhos que desenvolvem um modelo vacinal para a toxoplasmose avalia a proteção imune após o processo de imunização com ensaios de desafios (Li et al., 2015; Tao et al., 2013), mas realizados em um curto período após a imunização e normalmente utilizando apenas uma cepa do agente. Entretanto, para desenvolver um modelo vacinal para a toxoplasmose, os níveis de proteção teriam que apresentar efeitos mais duradouros, e se possível avaliar essa proteção com diferentes cepas do agente. Nosso modelo vacinal com parasitas irradiados apresenta características ideais para o desenvolvimento de uma vacina, pois o imunógeno induz no hospedeiro altos níveis de proteção com várias cepas, tanto do tipo II como do tipo III após períodos longos de desafio.

Os nossos dados demonstraram que os camundongos imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados por ambas as vias de imunização e camundongos cronicamente infectados com a cepa ME-49 apresentaram um aumento significativo de anticorpos IgG, IgA e IgM no soro. Isto é semelhante aos resultados descritos em que a infecção ou imunização com diferentes imunógenos para *T. gondii* promove uma resposta imune humoral significativa por meio da produção de anticorpos específicos, tais como IgG, IgA e IgM (Chen et al., 2014; Hassan et al., 2014). Essa resposta humoral é perfeitamente adaptada às características do patógeno proporcionando uma linha de defesa contra a infecção, atuando por meio de vários

mecanismos imunes para neutralizar ou até mesmo eliminar o agente ou a célula infectada (Vinuesa, Chang, 2013). Como em nossos estudos, a presença de anticorpos específicos no soro pode ser um meio para avaliar a eficácia da imunidade efetora para um determinado patógeno, já que anticorpos antígeno-específicos têm sido associados com a proteção vacinal contra muitas doenças (Casadevall, 2004). Em geral, a infecção por *T. gondii* é diagnosticada apenas por detecção de anticorpos específicos IgG e IgM no soro (Kotresha, Noordin, 2010), e a presença da IgM é útil como uma indicação de infecção aguda, que é crucial na triagem pré-natal (Petersen, 2007). Poucos têm estudado as funções imunológicas destes anticorpos, como em ensaios de proteção, (Denkers, Gazzinelli, 1998), embora alguns estudos tenham demonstrado a importância de células B e os seus produtos na toxoplasmose (Kang et al., 2000). Esta detecção de anticorpos é normalmente o único marcador da eficácia em modelos de vacinas, como por exemplo, uma vacina de DNA que codifica uma proteína antioxidante glutationa-S-transferase de *T. gondii* por via intramuscular, que também apresentou o aumento de anticorpos específicos IgG e IgM no soro (Wang et al., 2015). Em nossos modelos de imunização, os taquizoítos de *T. gondii* irradiados induzem uma forte resposta humoral com aumento de IgG sérica após 45 dias da imunização, e esses níveis de anticorpos correlaciona negativamente com a carga parasitária após o desafio, reforçando a importância destes anticorpos para proteção.

Os camundongos imunizados por ambas as vias de inóculo e os camundongos cronicamente infectados também apresentavam anticorpos IgA específicos no soro. Esta classe de anticorpos é produzida em maiores níveis nos animais imunizados por v.o., com evidências de maturação da afinidade. A IgA é o isotipo de anticorpo mais abundante produzido em mamíferos, a sua função primária é manter a homeostase em superfícies mucosas e desempenham um papel importante na proteção imunológica no intestino contra patógenos invasores (Macpherson et al., 2012). O aumento da resposta de IgA no soro dos animais que receberam o imunógeno por v.o., provavelmente pode estar relacionado com uma maior ativação de resposta imune de mucosa, devido ao fato da síntese de IgA ocorrer principalmente em tecidos linfóides associados a mucosa, e é excretado por um componente secretório no intestino (Woof, Kerr, 2006). Alguns destes anticorpos são secretados para o sangue como IgA monomérica, enquanto IgA secretora (S-IgA) dimérica é encontrada em secreções com diferentes funções imunes (Mkaddem

et al., 2014). A indução da resposta imune na região da mucosa pode levar ao complexo processamento do antígeno em locais específicos do tecido linfóide associado a mucosa, podendo resultar na produção de IgA monomérica ou S-IgA ou mesmo uma combinação das duas formas, favorecendo a eficácia do imunógeno (Pabst, 2012). Outros modelos de imunização também demonstraram o aumento de IgA no soro de camundongos imunizados por via intramuscular com uma vacina de DNA (Wang et al., 2014). A produção de S-IgA juntamente com a IgA monomérica foi observada em camundongos imunizados por via intranasal com diferentes peptídeos de *T. gondii* (AMA1, RON1 RON4) (Zhang et al., 2015). Um estudo anterior do nosso grupo demonstrou tanto a presença de IgA sérica como a S-IgA nas fezes de animais imunizados com taquizoítos de *T. gondii* irradiados (Zorgi et al., 2011). Tem-se descrito que a IgA específica reduz a invasão de enterócitos pelo agente, mas não em passos subsequentes, como lise mediada pelo complemento (Mack, Mcleod, 1992). Interessante notar que o aumento da produção de IgA em modelos vacinados por v.o., mostrou uma correlação inversa com o número de cistos teciduais, mostrando que esta imunoglobulina deve estar envolvida com proteção em processos anteriores à formação de cistos. Assim o tipo de proteção foi obtido em fases iniciais da infecção, e que são necessários estudos mais detalhados sobre a resposta imune induzida na mucosa do animal imunizado por v.o.

Nossos dados mostraram que a imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados induziu no hospedeiro uma resposta imune humoral de longa duração, com anticorpos IgG específicos circulantes por um período de 120 dias após a imunização. Esta resposta foi induzida sem quaisquer adjuvantes imunológicos existentes e necessários em outras vacinas com subcomponentes, mas que podem promover uma autoimunidade indesejada (Pellegrino et al., 2015). Provavelmente, a resposta humoral em longo prazo está associada com células produtoras de anticorpos, os plasmócitos antígeno-específicos obtidos do baço ou dos nódulos linfáticos, logo após a imunização, se diferenciam no centro germinativo e adquirem a capacidade de migrar para nichos de sobrevivência, principalmente na medula óssea, de onde podem produzir anticorpos específicos durante períodos prolongados (Shapiro-Shelef, Calame, 2005). Algumas células produtoras de anticorpos podem persistir, durante anos, no compartimento celular de estroma da medula óssea (Minges et al., 2002). Estudos anteriores realizados por nosso grupo relataram que há uma produção de anticorpos específicos por células da medula

óssea *in vitro* quando estimuladas especificamente (Zorgi et al., 2011). Estes dados sugerem que a imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados induzem uma resposta imune com a ativação de plasmócitos para a manutenção de níveis de anticorpos específicos de longo prazo no sangue.

Analisando o estado imunológico dos animais após a imunização, o fenótipo celular no sangue e baço, em nossos modelos, mostrou um aumento de células B ($CD19^+$), células TCD4 ($CD3^+CD4^+$) e células TCD8 ($CD3^+CD8^+$) que também apresentaram sinais de ativação. Nossos dados mostraram um maior aumento de células B ($CD19^+$) no sangue de camundongos imunizados por v.o., enquanto essas células foram mais frequentes no baço dos animais imunizados por via i.p., o que sugere diferentes vias de resposta imune (Meyer-Bahlburg, 2015) As células B de memória são geradas no intestino por vias tanto de células T-dependentes como células T-independentes, enquanto no baço, as células B de memória são geralmente induzidas por células T-dependentes (Fagarasan et al., 2010). Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo mostraram que além de anticorpos específicos de alta afinidade no soro, células esplênicas e células da medula óssea também produziram anticorpos de alta afinidade após a estimulação específica *in vitro* (Zorgi et al., 2011). No nosso modelo vacinal, os dois esquemas de imunização induziram células B de memória, e o aumento da produção de anticorpos de elevada afinidade de diferentes classes, sendo que a IgA de alta afinidade foi produzida em níveis mais elevados pela imunização oral e a IgG de alta afinidade foi produzida em níveis mais elevados pela imunização i.p.. A produção de anticorpos de alta afinidade ocorre, em geral, quando há uma re-exposição ao antígeno, sendo que a células induzidas na primeira resposta são reativadas e o processo resulta em um rápido aumento de anticorpos com elevada afinidade ao antígeno (McHeyzer-Williams, McHeyzer-Williams, 2005). As células B são essenciais para uma resposta imune efetora induzida por vacina, como a presença de células de memória, células ativadas e diferenciadas em plasmócitos (Plotkin, 2008). A presença do sinal de ativação por CD69 e os plasmócitos indicam um compromisso celular para as populações celulares de linfócitos B no baço dos camundongos imunizados por via i.p., enquanto que a ausência dessas células no baço de camundongos imunizados por v.o. sugerem que as células B e plasmócitos nesta via são comprometidos fora do baço. Em outros modelos, tais como infecção por *Francisella tularensis*, as células B são ativadas e subsequentemente, aumentam a expressão de CD69 nessa

população celular (Plzakova et al., 2014). Camundongos imunizados com a cepa Ts4 de *T. gondii* atenuada por via intracameral mostraram que as células B nos nódulos linfáticos regionais são essenciais para proteção ocular do hospedeiro (Lu et al., 2008). A importância das células B para a resistência da infecção por *T. gondii* tem sido demonstrada pela suscetibilidade para a doença em camundongos deficientes de células B, esses animais apresentaram uma mortalidade alta após a infecção com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e uma alta carga parasitária no sistema nervoso central (Kang et al., 2000). O estudo dos linfócitos B, plasmócitos e o desenvolvimento da ativação celular são elementos cruciais da resposta imune e da proteção do hospedeiro contra uma variedade de patógenos, já que o desenvolvimento dessa resposta resulta em células diferenciadas que exercem a função de induzir uma resposta imune humoral específica ao agente (Pieper et al., 2013). Nosso modelo vacinal para a toxoplasmose induziu um aumento da população de plasmócitos e linfócitos B ativados, com diversos locais de maturação e produção de diferentes classes de anticorpos, indicando que diferentes vias imunes podem cooperar para a proteção imunológica na toxoplasmose.

Nossos dados também mostraram um aumento de linfócitos T *helper* ($CD3^+CD4^+$) e linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) no sangue e no baço dos camundongos imunizados. As células TCD4 são importantes na geração e manutenção de ambas as respostas de células B e células $TCD8^+$, porque são controladas por fatores de crescimento ou citocinas fornecidos por sinais das células $TCD4^+$, além disso, essas células são necessárias para a maioria das respostas de anticorpos (Igietseme et al., 2004). O aumento de células $TCD4^+$ ($CD3^+CD4^+$) foi mais elevado no sangue de camundongos imunizados por v.o. e no baço de camundongos imunizados por via i.p. Já as células $TCD8^+$ foram aumentadas no sangue periférico e no baço de camundongos imunizados por ambas as vias de inóculo e camundongos cronicamente infectados. As células $TCD8^+$ são cruciais para o hospedeiro durante a infecção, porque essas células podem limitar a propagação de agentes infecciosos, principalmente parasitas intracelulares, por reconhecer e matar células infectadas ou secretar citocinas específicas (Grover et al., 2014; Moore et al., 2003). Tanto células $TCD4^+$ como $TCD8^+$ são necessárias para o controle da infecção latente na toxoplasmose crônica (Gazzinelli et al., 1992), a importância das células $TCD4^+$ foi demonstrada pela alta taxa de mortalidade em camundongos deficientes de células $TCD4^+$ que foram desafiados com a cepa não

letal ME-49 (Johnson, Sayles, 2002). Em outros modelos de imunização, com vacina de DNA (Mic 8) mostraram um aumento da população tanto de linfócitos $TCD4^+$ como linfócitos $TCD8^+$ esplênicos, que foi considerado importante para a indução da imunidade (Li et al., 2014). Vacinas vivas atenuadas, geralmente induzem no hospedeiro uma forte resposta citotóxica via linfócitos $TCD8^+$, que foi considerada importante para a proteção e essa resposta pode induzir uma imunidade similar a uma infecção (Bickle, 2009; Hanekom, 2005). Encontramos um aumento de células $TCD4^+$ ou $TCD8^+$ com baixa expressão CD45RB, mas alta expressão CD69 após a imunização. A ativação dessas células podem estar relacionadas com a atividade efetora ($TCD4^+$) ou citotóxica ($CD8^+$) das células (Ciabattini et al., 2008). Outros trabalhos com modelos de infecção com *Trypanosoma cruzi* mostraram uma dimuição significativa da expressão de CD45RB em linfócitos T $CD8^+$ esplênicos, que relatou a importância da ativação celular para a atividade citotóxica dessas células (Grisotto et al., 2001). A expressão de CD69 foi observada em linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ esplênicos de camundongos imunizados com vacina de DNA (ROP 18) (Yuan et al., 2011). A indução de células $TCD8^+$ em nossos modelos foi evidente tanto no baço como no sangue periférico, mas a sua ativação era evidente nos camundongos imunizados por via i.p. Os nossos dados sugerem que esta resposta podem ser importantes para o controle de cistos teciduais após a infecção, como o número de células $TCD8^+$ está inversamente relacionado com o número de parasitas no cérebro do hospedeiro.

Células $CD4^+$ e células B de memória proliferaram por estímulo de antígeno no baço de camundongos imunizados por via i.p. ou infectados por ME-49, mas não em camundongos imunizados por v.o.. Vários estudos de ensaios de proliferação celular em modelos de imunização ou infecção para a toxoplasmose utilizam ensaios que a maioria deles não analisa os fenótipos das células proliferadas. Por exemplo, na imunização com peptídeos de *T. gondii* (Zhang et al., 2015) ou com DNA composto com SAG1/SAG2 (Cong et al., 2013) apenas é mostrado o aumento da proliferação celular das células esplênicas de camundongos imunizados. Trabalhos anteriores do nosso grupo também mostraram a proliferação celular de células esplênicas de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados de *T. gondii* (Hiramoto et al., 2002). A fenotipagem celular juntamente com a proliferação determina qual célula responsiva que está envolvida na resposta induzida por um estímulo ou por um imunógeno, o que é essencial para a compreensão da

imunidade induzida (Quah et al., 2013). Nossos dados mostram que o nosso modelo vacinal induz a proliferação de células da resposta imune adaptativa de memória que estão presentes no baço dos camundongos imunizados por via i.p., mas não são encontradas no baço de animais que receberam a imunização por v.o.. As evidencias encontradas de proteção, resposta humoral e do estado imunológico dos animais imunizados por via oral apenas sugerem que o baço não é o local onde ocorre a resposta imune induzida por esta imunização.

A cooperação entre as células imunes é mediada por citocinas, e foram detectados vários produtos no sobrenadante de células esplênicas de camundongos imunizados estimuladas com antígeno. Os subconjuntos de populações de células foram definidos pela secreção de citocinas específicas; IFN-γ é produzida por células Th1, IL-4 é produzida por células Th2 e IL-17 por células Th17 (Zhu, Paul, 2008). Nosso modelo vacinal induziu nos animais uma resposta imune celular com maiores níveis de IFN-γ por células esplênicas após a estimulação específica, provavelmente indicando uma resposta imune integrada do tipo Th1/Th2 nos camundongos imunizados por via i.p., o subconjunto Th17 parece não participar neste processo. A imunização oral induziu uma produção baixa da maioria das citocinas por células esplênicas, que foi semelhante aos camundongos não imunizados. Esses dados corroboram com a literatura, onde a cooperação celular em modelos de imunização por via oral ou nasal ocorre em sítios específicos da imunidade de mucosa (Długońska, Grzybowski, 2012). A produção de IFN-γ durante a infecção aguda por *T. gondii* induz uma resposta imune celular significativa e eficaz (Gazzinelli et al., 1992). Ambas as células $TCD4^+$ e células $TCD8^+$ podem produzir IFN-γ durante a infecção intracelular, e a resposta induzida por células $TCD4^+$ é necessária para a ativação de macrófagos, que produzem uma potente resposta antimicrobiana (Cohen et al., 2013). Além disso, a resposta de células $TCD8^+$ induzida tem um papel fundamental no controle da infecção por matar especificamente as células infectadas (Kasper et al., 1992). O aumento da produção de IFN-γ também foi observada em camundongos imunizados com proteínas recombinantes (SAG1/2) (Chuang et al., 2013) ou vacina de DNA (Meng et al., 2012). A IL-10 é uma citocina imunoreguladora com ampla função, e as células $TCD4^+$ são consideradas uma importante fonte dessa citocina durante a infecção por *T. gondii*, por que a deleção do gene da IL-10 nessas células mostra que animais infectados apresentam uma

suscetibilidade a doença (Roers et al., 2004). Sendo assim, essa citocina pode desempenhar um papel importante no equilíbro entre a imunidade e o desenvolvimento da patologia da toxoplasmose (Wilson et al., 2005). Outros trabalhos de imunização para toxoplasmose, também mostraram que camundongos imunizados com proteínas recombinantes (ROP5) ou proteínas de superfície (SAG1) apresentaram um aumento da produção de IL-10 por células esplênicas (Zheng et al., 2003). A IL-4 é utilizada como um marcador para determinar o perfil da resposta imune em Th2, essa citocina induz a proliferação e diferenciação de células B e aumenta a expressão de MHC-II, possibilitando assim maior ativação das células Th2 (Nishida et al., 2013). A importância da IL-4 na toxoplasmose é evidente em camundongos deficientes em IL-4, sendo que esses animais apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente maior do que os controles imunocompetentes (Roberts et al., 1996). Em outros trabalhos que avaliaram outro tipo de modelo vacinal (DNA), mostrou uma alta resposta de IFN-γ com baixos níveis de IL-4 (Tao et al., 2013). Esta resposta imune celular induzida após imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados pode estar relacionado com o aumento das populações de células $TCD8^+$ e $TCD4^+$ no baço de camundongos imunizados, que auxiliam na proteção e assim diminuindo os parasitas no cérebro. A ausência de produção de citocinas por células esplênicas de animais imunizados por via oral, apenas reforça o conceito de que não é esse local desta produção de resposta imune.

Modelos vacinais que utilizam a radiação ionizante para esterilizar o agente induz uma imunidade semelhante à infecção natural, que pode desenvolver altos níveis de proteção, já que o agente irradiado não consegue completar o seu desenvolvimento ou até mesmo perder a capacidade reprodutiva, que normalmente está associada à doença (Bickle, 2009). Atualmente, a radiação ionizante foi utilizada como uma ferramenta para a produção de imunógenos para malária, em que esporozoítos irradiados de *Plasmodium falciparum* induzem uma proteção de 90% no hospedeiro após o desafio com esporozoítos virulentos, este modelo é usado como vacina para a prevenção de doença em países endémicos (Seder et al., 2013). As vacinas com radiação ionizante também foram desenvolvidas para vermes que ocorrem principalmente no Japão, China e Sudeste da Ásia, como opistorquíase, onde metacercárias de *Opisthorchis viverrini* irradiados induzem uma resposta imune protetora no hospedeiro após o desafio (Papatpremsiri et al., 2014). A produção de uma vacina para a toxoplasmose utilizando taquizoítos de *T. gondii*

irradiado tem características ideais para o estudo da resposta imune no hospedeiro, esse modelo de imunógeno não tem o desenvolvimento do patógeno, pois o parasita irradiado não consegue se dividir no interior da célula hospedeira e consequentemente não há formação de cistos teciduais e, portanto, o hospedeiro não desenvolve a doença.

Os nossos dados consolidados sugerem que uma vacina para a toxoplasmose utilizando taquizoítos de *T. gondii* irradiados apresenta características imunológicas que são fundamentais para o desenvolvimento de um imunógeno eficaz para a doença. Independentemente da via de inoculo, a imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados fornece uma imunidade duradoura no hospedeiro. Na imunização por via i.p. nós temos uma ativação da resposta imune com maior aumento de células $TCD4^+$, $TCD8^+$ e células B no baço do que no sangue periférico, essa resposta é mediada por produção de IFN-γ e o aumento da proliferação celular dessas populações também mostra o comprometimento da cooperação celular com o antígeno. O resultado dessa resposta imune induzida no baço dos animais imunizados por via i.p. mostra uma forte resposta imune humoral sérica com aumento de produção de anticorpos específicos de diferentes classes, com destaque na maior produção de anticorpos IgG e células T $CD8^+$ anti-*T. gondii* (Figura 31).

Na imunização por v.o., nós temos uma resposta imune que induz um aumento de células $TCD4^+$, $TCD8^+$ e células B no sangue periférico, com ausência de citocinas produzidas por células esplênicas e a baixa resposta proliferativa dessas células. Animais imunizados por v.o. mostram que a reposta imune induzida ocorre fora do baço, que provavelmente induz uma resposta imune na mucosa. O resultado dessa resposta nos animais que receberam o imunógeno por v.o., apresentaram uma imunidade humoral específica com maiores níveis de IgA sérica. Essa resposta imune na mucosa induzida pela via de administração da vacina, apesar de apresentar resultados promissores de proteção, implica em aprimoramento do estudo da imunologia no local, como por exemplo, análise de populações celulares nas placas de Peyer (Figura 31). Nos animais imunizados, nossas tentativas de estudar a população linfoíde intestinal em placas de Peyer resultaram em número insuficiente de células para o estudo citométrico (dados não mostrados), mas em grupos de animais onde estas células estão ampliadas, como

animais submetidos à dieta com probióticos, nós conseguimos realizar estes ensaios (Ribeiro et al., 2015).

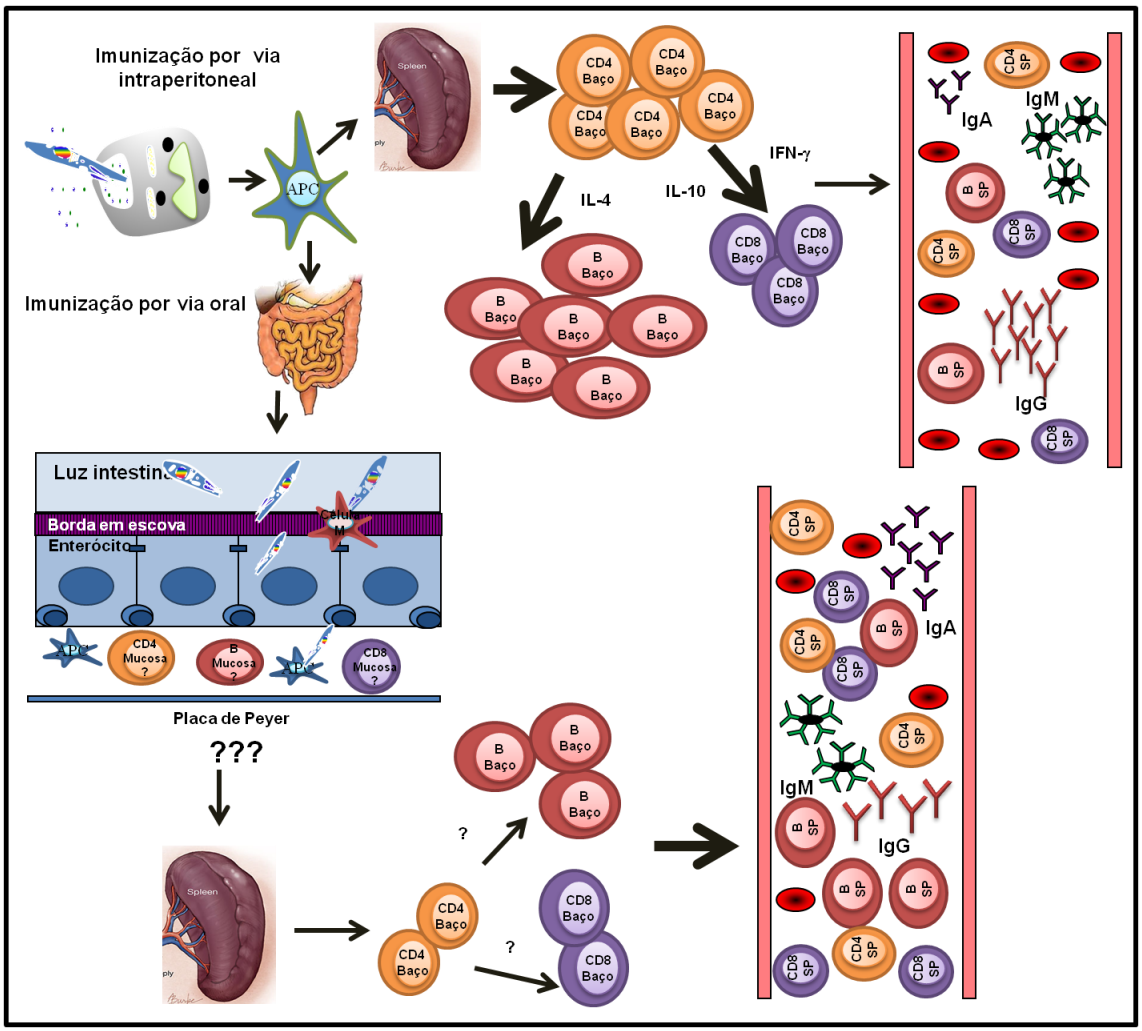


Figura 31: Esquema da resposta imune induzida por taquizoítos de *T. gondii* irradiados por diferentes vias de administração. Na imunização por via intraperitoneal observamos um aumento de células B, células TCD4^{+} e TCD8^{+} no baço e não no sangue periférico. A resposta imune humoral induzida mostrou um aumento de anticorpos IgG no soro. A resposta celular nas células esplênicas mostrou um aumento da produção de IFN-γ, IL-4 e IL-10. Na imunização por via oral observamos o aumento de células B, células TCD4+ e TCD8+ no sangue periférico e não no baço. A resposta imune humoral induzida mostrou um aumento de anticorpos IgA no soro. A resposta celular nas células esplênicas foi ausente ou similar aos animais controles.

Nossos resultados mostram que há uma interação complexa do parasita com seu hospedeiro, que exigirá abordagens mais complexas de uma vacina. Como demonstramos no trabalho, usando a mesma preparação do modelo vacinal e abordagens diversificadas, como a imunização oral e a intraperitoneal, a vacina induz uma proteção imunológica aparentemente por diversos caminhos, e

provavelmente esses caminhos podem cooperar para oferecer uma proteção completa (Figura 32).

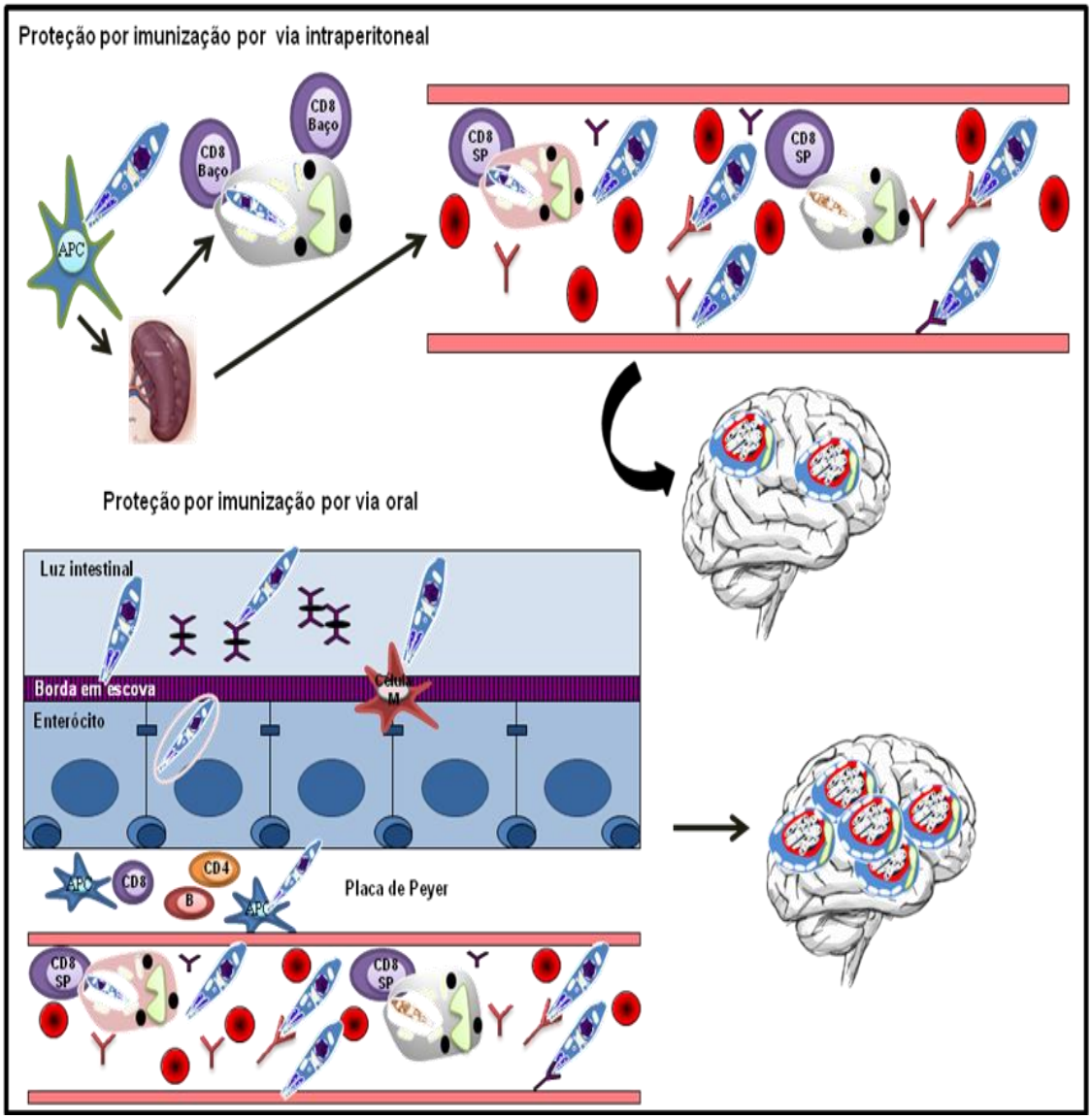


Figura 32: Esquema da proteção induzida por imunização por via intraperitoneal e por via oral com taquizoítos de *T. gondii* irradiados. Nota-se que as células TCD8^{+} e a resposta imune humoral induzida favorecem a proteção. Na imunização por via intraperitoneal resposta imune induzida diminuiu a carga parasitária no cérebro, já a imunização por via oral os animais apresentaram uma carga parasitária maior no cérebro.

Nossa preparação vacinal é produzida por taquizoítos facilmente produzidos e submetidos à radiação ionizante. Esse modelo é desprovido de qualquer adjuvante e induz uma proteção significativa em modelos experimentais que está associada à resposta específica imune humoral e celular. Esta vacina deve ser testada em outros protocolos para aumentar a proteção, mas podemos sugerir que esse modelo utilizando a radiação ionizante poderia ser uma ótima alternativa para uso

veterinário, e assim reduzir a produção de oocistos em felídeos, resultando em baixos níveis de cistos na carne de animais de consumo e consequentemente diminuiria a contaminação em humanos.

Nossos dados mostram que a proteção induzida por nossa vacina é dependente da via de administração com diferentes vias imunes. Sugere-se que a doença seja uma sequência de eventos, tanto relacionados à invasão inicial do hospedeiro quanto à eliminação ou controle do agente ou de células infectadas. Estes eventos ocorrem em diferentes ambientes do hospedeiro, apesar de que nosso estudo não conseguiu avaliar todos eles. Quando se pensa em vacina de coccídeos, as características dos agentes, seu ciclo de vida e suas formas de resistência são um problema analítico enorme e frequentemente vemos reportes que analisam um único aspecto para explicar toda a imunologia deste fascinante agente. Para uma vacina eficiente, precisamos de uma complexidade semelhante à sua interação na infecção. Qualquer simplificação na explicação destes processos pode resultar em dogmas e atraso científico, como foi claramente demonstrado na dificuldade de produção de vacinas para malária.

7 CONCLUSÕES

7.1 Gerais

- ✓ Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* esterilizados por radiação ionizante induzem uma proteção parcial, por ambas as vias de administração do agente, oral ou i.p., por aumento das populações celulares de linfócitos T e B, aumento de anticorpos específicos e citocinas.

7.2 Específicas

- ✓ Camundongos imunizados por ambas as vias de administração, oral ou i.p., com taquizoítos de *T. gondii* irradiados apresentaram uma proteção parcial após desafios de 90 dias após a última dose com a cepa ME-49 e VEG de *T. gondii.*

- ✓ Ambas as vias de imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados induziram uma resposta imune humoral específica, porém camundongos que receberam o imunógeno por via i.p. demonstraram um aumento de anticorpos IgG e IgM, e a resposta de anticorpos IgG se mantém por 120 dias após a imunização. Enquanto os camundongos imunizados por v.o. demonstraram aumento de anticorpos IgA.

- ✓ A qualidade dos anticorpos foi avaliada por afinidade ao antígeno, que foi alta nos dois modelos de imunização, IgG e IgM para imunização i.p. e IgA para imunização oral, mostrando uma maturação da resposta imune.

- ✓ No sangue, o animal imunizado demonstra um aumento discreto e perceptivo do arsenal imunológico, que foi diferenciado na vacinação i.p. e oral. Camundongos imunizados por v.o. demonstraram um aumento das populações de lifócitos T $CD4^+$, T $CD8^+$, linfócitos B e plasmócitos, enquanto isso, os camundongos imunizados por via i.p. demonstraram apenas um aumento da população de linfócitos T $CD8^+$.

- ✓ No baço os animais imunizados por via i.p. demonstraram maior arsenal imunológico, com aumento discreto e significativo das populações de linfócitos T $CD4^+$, T $CD8^+$, linfócitos B e plasmócitos, sendo que, nos animais imunizados por v.o. algumas populações foram insignificantes.

- ✓ Quanto ao estado de ativação celular desse arsenal imunológico, os animais imunizados por via i.p. demonstraram maiores sinais de ativação, mostrando a diferenciação das vias de administração da vacina.

- ✓ Células do baço de camundongos imunizados por via i.p. e desafiadas com antígeno responderam positivamente com aumento da resposta imune celular, com produção significativa de citocinas, como IL-10, IL-4 e IFN-γ.

- ✓ Houve proliferação desencadeada por antígeno em Linfócitos T $CD4^+$ e linfócitos B esplênicos de camundongos imunizados por via i.p., mas não por v.o., mostrando que taquizoítos de *T. gondii* esterilizados por radiação ionizante induzem uma memória imunológica a nível esplênico.

REFERÊNCIAS[1]

Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. J Infect Dis. 2003 Aug 15;188(4):608-16.

Abedalthagafi M, Rushing EJ, Garvin D, Cheson B, Ozdemirli M. Asymptomatic diffuse "encephalitic" cerebral toxoplasmosis in a patient with chronic lymphocytic leukemia: case report and review of the literature. Int J Clin Exp Pathol. 2009 Mar 15;3(1):106-9.

Adurthi S, Mahadevan A, Bantwal R, Satishchandra P, Ramprasad S, Sridhar H,Shankar SK, Nath A, Jayshree RS. Utility of molecular and serodiagnostic tools in cerebral toxoplasmosis with and without tuberculous meningitis in AIDS patients: A study from South India. Ann Indian Acad Neurol. 2010 Oct;13(4):263-70.

Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (Felis catus). Int J Parasitol. 2006 Nov;36(13):1373-82.

Aliberti J, Bafica A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005 Sep-Oct;73(3-4):283-8.

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;96(3):505-8.

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 NogarebER, De Marco M, Moretti F, Corsi P, Abrescia N, Rellecati P, Castagna A, Mussini C, Ammassari A, Cinque P, d'Arminio Monforte A; Italian Registry Investigative NeuroAIDS. 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 1;39(11):1681-91.

Bachmann S, Schröder J, Bottmer C, Torrey EF, Yolken RH. Psychopathology in first-episode schizophrenia and antibodies to *Toxoplasma gondii.* Psychopathology. 2005 Mar-Apr;38(2):87-90.

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis. 2003 Jan;9(1):55-62.

Bayarri S, Gracia MJ, Lázaro R, Pe Rez-Arquillué C, Barberán M, Herrera A. Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* in cured ham using bioassay:

[1] De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

influence of technological processing and food safety implications. J Food Prot. 2010 Dec;73(12):2239-43.

Berger-Schoch AE, Herrmann DC, Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B,Frey CF. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts)and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. Vet Parasitol. 2011 May 11;177(3-4):290-7.

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

Bickle QD. Radiation-attenuated schistosome vaccination--a brief historical perspective. Parasitology. 2009 Oct;136(12):1621-32.

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.

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

Calero-Bernal R, Gómez-Gordo L, Saugar JM, Frontera E, Pérez-Martín JE, Reina D, Serrano FJ, Fuentes I. Congenital toxoplasmosis in wild boar (Sus scrofa) and identification of the *Toxoplasma gondii* types involved. J Wildl Dis. 2013 Oct;49(4):1019-23.

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.

Campos FA, Andrade GM, Lanna Ade P, Lage BF, Assumpção MV, Pinto JA. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. Braz J Infect Dis. 2014 Nov-Dec;18(6):609-17.

Cardi BA, Nascimento N, Andrade HF Jr. Irradiation of Crotalus durissus terrificus crotoxin with 60Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. Int J Radiat Biol. 1998 May;73(5):557-64.

Casadevall A. The methodology for determining the efficacy of antibody-mediated immunity. J Immunol Methods. 2004 Aug;291(1-2):1-10.

Cavalcante GT, Aguilar DM, Camargo LM, Labruna MB, de Andrade HF, Meireles LR,Dubey JP, Thulliez P, Dias RA, Gennari SM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. J Parasitol. 2006 Jun;92(3):647-9.

Chen J, Li ZY, Huang SY, Petersen E, Song HQ, Zhou DH, Zhu XQ. Protective efficacy of *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) adjuvated with recombinant IL-15 and IL-21 against experimental toxoplasmosis in mice. BMC Infect Dis. 2014 Sep 6;14:487.

Chen R, Lu SH, Tong QB, Lou D, Shi DY, Jia BB, Huang GP, Wang JF. Protective effect of DNA-mediated immunization with liposome-encapsulated GRA4 against infection of *Toxoplasma gondii*. J Zhejiang Univ Sci B. 2009 Jul;10(7):512-21.

Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. Nat Rev Immunol. 2011 Jun 17;11(7):445-56.

Chuang SC, Ko JC, Chen CP, Du JT, Yang CD. Encapsulation of chimeric protein rSAG1/2 into poly (lactide-co-glycolide) microparticles induces long-term protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice. Exp Parasitol. 2013 Apr 26;134(4):430-437.

Ciabattini A, Pettini E, Andersen P, Pozzi G, Medaglini D. Primary activation of antigen-specific naive CD4+ and CD8+ T cells following intranasal vaccination with recombinant bacteria. Infect Immun. 2008 Dec;76(12):5817-25.

Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. Mutat Res. 2004 Dec 2;568(1):5-20.

Cohen SB, Denkers EY. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 2015 Mar;37(3):108-17.

Cohen SB, Maurer KJ, Egan CE, Oghumu S, Satoskar AR, Denkers EY.CXCR3-dependent $CD4^+$ T cells are required to activate inflammatory monocytes for defense against intestinal infection. PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003706.

Cong H, Zhang M, Xin Q, Wang Z, Li Y, Zhao Q, Zhou H, He S. Compound DNA vaccine encoding SAG1/ SAG3 with A2/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii* . Parasit Vectors. 2013 Mar 13;6:63.

Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. Cell. 2006 Feb 24;124(4):815-22.

De Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RM, da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. Emerg Infect Dis. 2006 Feb;12(2):326-9.

De Rosa SC. Vaccine applications of flow cytometry. Methods. 2012 Jul;57(3):383-91.

Delair E, Monnet D, Grabar S, Dupouy-Camet J, Yera H, Brézin AP. Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. Am J Ophthalmol. 2008 Dec;146(6):851-5.

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev. 1998 Oct;11(4):569-88.

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

Długońska H, Grzybowski M. Mucosal vaccination--an old but still vital strategy. Ann Parasitol. 2012;58(1):1-8.

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, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.Parasitology. 2012 Sep;139(11):1375-424.

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 Mar;47(3):518-22.

Dubey JP, Graham DH, De Young RW, Dahl E, Eberhard ML, Nace EK, Won K, Bishop H, Punkosdy G, Sreekumar C, Vianna MC, Shen SK, Kwok OC, Sumners JA, Demarais S, Humphreys JG, Lehmann T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. J Parasitol. 2004 Feb;90(1):67-71.

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, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites,bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998 Apr;11(2):267-99.

Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii* . Int J Parasitol. 2009 Jul 1;39(8):877-82.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* --the first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008 Nov-Dec;55(6):467-75.

Dubey JP, Hotea I, Olariu TR, Jones JL, Dărăbuş G. Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. Parasitology. 2014 Mar;141(3):311-25.

Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Semin Immunopathol. 2012 Nov;34(6):793-813.

Egan CE, Cohen SB, Denkers EY. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. Immunol Cell Biol. 2012 Aug;90(7):668-75.

Ekman CC, Chiossi MF, Meireles LR, Andrade Júnior HF, Figueiredo WM, Marciano MA, Luna EJ. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in an industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012 Sep-Oct;54(5):239-44.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* : epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends Parasitol. 2010 Apr;26(4):190-6.

Emelia O, Amal RN, Ruzanna ZZ, Shahida H, Azzubair Z, Tan KS, Noor Aadila S,Siti NA, Aisah MY. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibody in patients with schizophrenia. Trop Biomed. 2012 Mar;29(1):151-9.

Erbe DV, Pfefferkorn ER, Fanger MW. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii* . J Immunol. 1991 May 1;146(9):3145-51.

Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. Clin Microbiol Rev. 2013 Jan;26(1):58-85.

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.

Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. Annu Rev Immunol.2010;28:243-73.

Flegr J, Zitková S, Kodym P, Frynta D. Induction of changes in human behavior by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* . Parasitology. 1996 Jul;113 (Pt1):49-54.

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.

Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii* . J Immunol. 1992 Jul 1;149(1):175-80.

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 1;146(1):286-92.

Gibson AK, Raverty S, Lambourn DM, Huggins J, Magargal SL, Grigg ME. Polyparasitism is associated with increased disease severity in *Toxoplasma gondii* -infected marine sentinel species. PLoS Negl Trop Dis. 2011 May;5(5):e1142.

Grigg ME, Dubey JP, Nussenblatt RB. Ocular toxoplasmosis: lessons from Brazil. Am J Ophthalmol. 2015 Jun;159(6):999-1001.

Grisotto MG, D'Império Lima MR, Marinho CR, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA, Alvarez JM. Most parasite-specific CD8+ cells in Trypanosoma cruzi-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alphabeta and CD8 molecules. Immunology. 2001 Feb;102(2):209-17.

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

Grover HS, Chu HH, Kelly FD, Yang SJ, Reese ML, Blanchard N, Gonzalez F, Chan SW, Boothroyd JC, Shastri N, Robey EA. Impact of regulated secretion on antiparasitic CD8 T cell responses. Cell Rep. 2014 Jun 12;7(5):1716-28.

Grzybowski MM, Dziadek B, Gatkowska JM, Dzitko K, Długońska H. Towards vaccine against toxoplasmosis: evaluation of the immunogenic and protective activity of recombinant ROP5 and ROP18 *Toxoplasma gondii* proteins. Parasitol Res. 2015 Sep 4. [Epub ahead of print].

Halsby K, Guy E, Said B, Francis J, O'Connor C, Kirkbride H, Morgan D. Enhanced surveillance for toxoplasmosis in England and Wales, 2008-2012. Epidemiol Infect. 2014 Aug;142(8):1653-60.

Hamdani N, Daban-Huard C, Lajnef M, Richard JR, Delavest M, Godin O, Le Guen E, Vederine FE, Lépine JP, Jamain S, Houenou J, Le Corvoisier P, Aoki M,Moins-Teisserenc H, Charron D, Krishnamoorthy R, Yolken R, Dickerson F, Tamouza R, Leboyer M. Relationship between *Toxoplasma gondii* infection and bipolar disorder in a French sample. J Affect Disord. 2013 Jun;148(2-3):444-8.

Hanekom WA. The immune response to BCG vaccination of newborns. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1062:69-78.

Hassan IA, Wang S, Xu L, Yan R, Song X, XiangRui L. Immunological response and protection of mice immunized with plasmid encoding *Toxoplasma gondii* glycolytic enzyme malate dehydrogenase. Parasite Immunol. 2014 Dec;36(12):674-83.

Havlícek J, Gasová ZG, Smith AP, Zvára K, Flegr J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. Parasitology. 2001 May;122(Pt 5):515-20.

Herrmann DC, Maksimov P, Hotop A, Groß U, Däubener W, Liesenfeld O, Pleyer U, Conraths FJ, Schares G. Genotyping of samples from German patients with ocular,cerebral and systemic toxoplasmosis reveals a predominance of *Toxoplasma gondii* type II. Int J Med Microbiol. 2014 Oct;304(7):911-6.

Heukelbach J, Meyer-Cirkel V, Moura RC, Gomide M, Queiroz JA, Saweljew P, Liesenfeld O. Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. Emerg Infect Dis.2007 Feb;13(2):287-9.

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.

Hiszczyńska-Sawicka E, Gatkowska JM, Grzybowski MM, Długońska H. Veterinary vaccines against toxoplasmosis. Parasitology. 2014 Sep;141(11):1365-78.

Hoffman SL, Billingsley PF, James E, Richman A, Loyevsky M, Li T, Chakravarty S, Gunasekera A, Chattopadhyay R, Li M, Stafford R, Ahumada A, Epstein JE,Sedegah M, Reyes S, Richie TL, Lyke KE, Edelman R, Laurens MB, Plowe CV, Sim BK. Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent Plasmodium falciparum malaria. Hum Vaccin. 2010 Jan;6(1):97-106.

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

Hotop A, Buschtöns S, Bangoura B, Zöller B, Koethe M, Spekker-Bosker K, Hotop SK, Tenter AM, Däubener W, Straubinger RK, Groß U. Humoral immune responses in chickens and turkeys after infection with *Toxoplasma gondii* by using recombinant antigens. Parasitol Res. 2014 Apr;113(4):1473-80.

Igietseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. Antibody regulation of T cell immunity:implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. Expert Rev Vaccines. 2004 Feb;3(1):23-34.

Innes EA, Bartley PM, Rocchi M, Benavidas-Silvan J, Burrells A, Hotchkiss E,Chianini F, Canton G, Katzer F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? Vet Parasitol. 2011;180(1-2):155-63.

Ishii KJ, Akira S. Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. J Clin Immunol. 2007 Jul;27(4):363-71.

Jafari R, Sadaghian M, Safari M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and related risk factors in Tabriz City, Iran, 2008. J Res Health Sci. 2012 Dec 13;12(2):119-21.

Johnson LL, Sayles PC. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. Infect Immun. 2002 Jan;70(1):185-91.

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. Exp Parasitol. 2010 Jan;124(1):10-25.

Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 2012;55(6):845-51.

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

Ju CH, Chockalingam A, Leifer CA. Early response of mucosal epithelial cells during *Toxoplasma gondii* infection. J Immunol. 2009 Dec 1;183(11):7420-7.

Kang H, Remington JS, Suzuki Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma,TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. J Immunol. 2000 Mar 1;164(5):2629-34.

Kasper LH, Khan IA, Ely KH, Buelow R, Boothroyd JC. Antigen-specific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii* -infected peritoneal macrophages. J Immunol. 1992 Mar 1;148(5):1493-8.

Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. Int J Parasitol. 2004 Mar 9;34(3):423-32.

Kniel KE, Lindsay DS, Sumner SS, Hackney CR, Pierson MD, Dubey JP. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. J Parasitol. 2002 Aug;88(4):790-3.

Kotresha D, Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis.APMIS. 2010 Aug;118(8):529-42.

Laliberté J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii* . Cell Mol Life Sci. 2008 Jun;65(12):1900-15.

Leal FE, Cavazzana CL, de Andrade HF Jr, Galisteo A Jr, de Mendonça JS, Kallas EG. *Toxoplasma gondii* pneumonia in immunocompetent subjects: case report and review. Clin Infect Dis. 2007 Mar 15;44(6):e62-6.

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.

Li XZ, Wang XH, Xia LJ, Weng YB, Hernandez JA, Tu LQ, Li LT, Li SJ, Yuan ZG.Protective efficacy of recombinant canine adenovirus type-2 expressing TgROP18 (CAV-2-ROP18) against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. BMC Infect Dis. 2015 Mar 4;15(1):114.

Li ZY, Chen J, Petersen E, Zhou DH, Huang SY, Song HQ, Zhu XQ. Synergy of mIL-21 and mIL-15 in enhancing DNA vaccine efficacy against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. Vaccine. 2014 May 23;32(25):3058-65.

Lim SS, Othman RY. Recent advances in *Toxoplasma gondii* immunotherapeutics. Korean J Parasitol. 2014 Dec;52(6):581-93.

Liu MM, Yuan ZG, Peng GH, Zhou DH, He XH, Yan C, Yin CC, He Y, Lin RQ, Song HQ, Zhu XQ. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis. Parasitol Res. 2010 Apr;106(5):1079-84.

Liu Q, Singla LD, Zhou H. Vaccines against *Toxoplasma gondii* : status, challenges and future directions. Hum Vaccin Immunother. 2012 Sep;8(9):1305-8.

Liu Q, Wang F, Wang G, Zhao Q, Min J, Wang S, Cong H, Li Y, He S, Zhou H. *Toxoplasma gondii* : immune response and protective efficacy induced by ROP16/GRA7 multicomponent DNA vaccine with a genetic adjuvant B7-2. Hum Vaccin Immunother.2014;10(1):184-91.

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 1;21(3):275-83.

Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. Oncogene. 2003 Oct 13;22(45):7058-69.

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 15;197(10):1419-26.

Lu G, Wang L, Zhou A, Han Y, Guo J, Song P, Zhou H, Cong H, Zhao Q, He S. Epitope analysis, expression and protection of SAG5A vaccine against *Toxoplasma gondii* . Acta Trop. 2015 Jun;146:66-72.

Luma HN, Tchaleu BC, Temfack E, Doualla MS, Ndenga DP, Mapoure YN, Njamnshi AK, Djientcheu VD. HIV-Associated Central Nervous System Disease in Patients Admitted at the Douala General Hospital between 2004 and 2009: A Retrospective Study. AIDS Res Treat. 2013;2013:709810.

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

Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. Trends Immunol. 2012 Apr;33(4):160-7.

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.

Martina MN, Cervera C, Esforzado N, Linares L, Torregrosa V, Sanclemente G,Hoyo I, Cofan F, Oppenheimer F, Miro JM, Campistol JM, Moreno A. *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. Transpl Int. 2011 Jan;24(1):e6-12.

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

Meireles LR, Ekman CCJ, Andrade HF Jr, Luna EJA.Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. 2015. In press.

Meireles LR, Galisteo AJ Jr, Andrade HF Jr. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* [online]. 2003;40(4):267-71.

Meng M, He S, Zhao G, Bai Y, Zhou H, Cong H, Lu G, Zhao Q, Zhu XQ. Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice. Parasit Vectors. 2012 Nov 26;5:273.

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.

Meyer-Bahlburg A. B-1 cells as a source of IgA. Ann N Y Acad Sci. 2015 Jun 9. In press.

Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii* . Int J Parasitol. 2009 Jan;39(1):23-39.

Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. J Immunol. 2002 Oct 15;169(8):4213-21.

Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Wang YW, Murray D. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. Int J Mol Sci. 2013 Nov 13;14(11):22409-35

Mkaddem SB, Christou I, Rossato E, Berthelot L, Lehuen A, Monteiro RC. IgA, IgA receptors, and their anti-inflammatory properties. Curr Top Microbiol Immunol. 2014;382:221-35. doi: 10.1007/978-3-319-07911-0_10.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.
Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin Infect Dis. 2008 Aug 15;47(4):554-66.

Moon S, Song KB. Effect of γ-irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. Food Chemistry.2001 (74): 479–483.

Moore T, Ekworomadu CO, Eko FO, MacMillan L, Ramey K, Ananaba GA, Patrickson JW, Nagappan PR, Lyn D, Black CM, Igietseme JU. Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens. J Infect Dis. 2003 Aug 15;188(4):617-24.

Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii* . Immunol Rev. 2011 Mar;240(1):269-85.

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.

Nishida J, Li Y, Zhuang Y, Huang Z, Huang H. IFN-γ suppresses permissive chromatin remodeling in the regulatory region of the Il4 gene. Cytokine. 2013 Apr;62(1):91-5.

Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. Nat Rev Immunol. 2012 Dec;12(12):821-32.

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

Papatpremsiri A, Junpue P, Loukas A, Brindley PJ, Bethony JM, Sripa B, Laha T.Immunization and challenge shown by hamsters infected with Opisthorchis viverrini following exposure to gamma-irradiated metacercariae of this carcinogenic liver fluke. J Helminthol. 2014 Oct 15:1-9.

Parthasarathy S, Fong MY, Ramaswamy K, Lau YL. Protective immune response in BALB/c mice induced by DNA vaccine of the ROP8 gene of *Toxoplasma gondii* . Am J Trop Med Hyg. 2013 May;88(5):883-7.

Pellegrino P, Clementi E, Radice S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity:Current evidence and future perspectives. Autoimmun Rev. 2015 Oct;14(10):880-8.

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

Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. J Allergy Clin Immunol. 2013 Apr;131(4):959-71.

Plotkin SA. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. Clin Infect Dis. 2008 Aug 1;47(3):401-9.

Plzakova L, Kubelkova K, Krocova Z, Zarybnicka L, Sinkorova Z, Macela A. B cell subsets are activated and produce cytokines during early phases of Francisella tularensis LVS infection. Microb Pathog. 2014 Oct;75:49-58.

Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. Clin Exp Vaccine Res. 2015 Jan;4(1):23-45.

Quah BJ, Wijesundara DK, Ranasinghe C, Parish CR. Fluorescent target array T helper assay: a multiplex flow cytometry assay to measure antigen-specific CD4+ T cell-mediated B cell help in vivo. J Immunol Methods. 2013 Jan 31;387(1-2):181-90.

Ribeiro C, Zorgi NE, Meireles L, Andrade Jr HF. Induction of CD19 lymphocyte proliferation by *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* in C57BL/6 mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. 2015. In press.

Robbins ME, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. Int J Radiat Biol. 2004 Apr;80(4):251-9.

Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012 Apr;25(2):264-96.

Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J.Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun. 1996 Mar;64(3):897-904.

Roers A, Siewe L, Strittmatter E, Deckert M, Schlüter D, Stenzel W, Gruber AD,Krieg T, Rajewsky K, Müller W. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. J Exp Med. 2004 Nov 15;200(10):1289-97.

Rostami A, Keshavarz H, Shojaee S, Mohebali M, Meamar AR. Frequency of *Toxoplasma gondii* in HIV Positive Patients from West of Iran by ELISA and PCR.Iran J Parasitol. 2014 Oct-Dec;9(4):474-81.

Rothova A. Ocular manifestations of toxoplasmosis. Curr Opin Ophthalmol. 2003 Dec;14(6):384-8.

Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. Trends Immunol. 2005 Mar;26(3):136-40.

Sanos SL, Diefenbach A. Innate lymphoid cells: from border protection to the initiation of inflammatory diseases. Immunol Cell Biol. 2013 Mar;91(3):215-24.

Santos PS, Albuquerque GR, da Silva VM, Martin AR, Marvulo MF, Souza SL,Ragozo AM, Nascimento CC, Gennari SM, Dubey JP, Silva JC. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (Inia geoffrensis) from central Amazon, Brazil. Vet Parasitol. 2011 Dec 29;183(1-2):171-3.

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.

Seder RA, Chang LJ, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, Holman LA,James ER, Billingsley PF, Gunasekera A, Richman A, Chakravarty S, Manoj A,Velmurugan S, Li M, Ruben AJ, Li T, Eappen AG, Stafford RE, Plummer SH, Hendel CS, Novik L, Costner PJ, Mendoza FH, Saunders JG, Nason MC, Richardson JH, Murphy J, Davidson SA, Richie TL, Sedegah M, Sutamihardja A, Fahle GA, Lyke KE, Laurens MB, Roederer M, Tewari K, Epstein JE, Sim BK, Ledgerwood JE, Graham BS, Hoffman SL; VRC 312 Study Team. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. Science. 2013 Sep 20;341(6152):1359-65.

Sepúlveda-Arias JC, Gómez-Marin JE, Bobić B, Naranjo-Galvis CA, Djurković-Djaković O. Toxoplasmosis as a travel risk. Travel Med Infect Dis. 2014 Nov-Dec;12(6 Pt A):592-601.

Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. Nat Ver Immunol. 2005 Mar;5(3):230-42.

Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. Nat Rev Immunol. 2009 Mar;9(3):185-94.

Smith G. Food- and water-borne disease: using case control studies to estimate the force of infection that accounts for primary, sporadic cases. Epidemics. 2013 Jun;5(2):77-84.

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.

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

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

Tao Q, Fang R, Zhang W, Wang Y, Cheng J, Li Y, Fang K, Khan MK, Hu M, Zhou Y, Zhao J. Protective immunity induced by a DNA vaccine-encoding *Toxoplasma gondii* microneme protein 11 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. Parasitol Res. 2013 Jun 10.

Teo WH, Nurul AA, Norazmi MN. Immunogenicity of recombinant BCG-based vaccine expressing the 22 kDa of serine repeat antigen (SE22) of Plasmodium falciparum.Trop Biomed. 2012 Jun;29(2):239-53.

Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Bull World Health Organ. 2013 Jul 1;91(7):501-8.

Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. Schizophr Bull. 2012 May;38(3):642-7.

Vasconcelos-Santos DV. Ocular manifestations of systemic disease: toxoplasmosis. Curr Opin Ophthalmol. 2012 Nov;23(6):543-50.

Vinuesa CG, Chang PP. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. Nat Immunol. 2013 Feb;14(2):119-26.

Vitale M, Tumino G, Partanna S, La Chiusa S, Mancuso G, Giglia ML, Presti VD. Impact of traditional practices on food safety: a case of acute toxoplasmosis related to the consumption of contaminated raw pork sausage in Italy. J Food Prot. 2014 Apr;77(4):643-6.

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.

Walle F, Kebede N, Tsegaye A, Kassa T. Seroprevalence and risk factors for Toxoplasmosis in HIV infected and non-infected individuals in Bahir Dar,Northwest Ethiopia. Parasit Vectors. 2013 Jan 16;6(1):15.

Wang HL, Pang M, Yin LT, Zhang JH, Meng XL, Yu BF, Guo R, Bai JZ, Zheng GP,Yin GR. Intranasal immunisation of the recombinant *Toxoplasma gondii* receptor for activated C kinase 1 partly protects mice against *T. gondii* infection. Acta Trop. 2014 Sep;137:58-66.

Wang L, He LY, Meng DD, Chen ZW, Wen H, Fang GS, Luo QL, Huang KQ, Shen JL. Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in cancer patients in Anhui Province, Eastern China. Parasit Vectors. 2015 Mar 15;8:162.

Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszinski F, Hunter CA. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. J Neuroimmunol. 2005 Aug;165(1-2):63-74.

Woods RJ, Pickaev AK. Applied radiation chemistry. New York: John Wiley and Sons; 1994.

Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. J Pathol. 2006 Jan;208(2):270-82.

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

Yuan ZG, Zhang XX, Lin RQ, Petersen E, He S, Yu M, He XH, Zhou DH, He Y, Li HX, Liao M, Zhu XQ. Protective effect against toxoplasmosis in mice induced by DNA immunization with gene encoding *Toxoplasma gondii* ROP18. Vaccine. 2011 Sep 2;29(38):6614-9.

Zak DE, Aderem A. Systems integration of innate and adaptive immunity. Vaccine. 2015 Jun 21. pii: S0264-410X(15)00782-3.

Zhang TE, Yin LT, Li RH, Wang HL, Meng XL, Yin GR. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. Parasit Vectors. 2015 Jan 13;8(1):15.

Zhao Y, Huang B, Huang S, Zheng H, Li YQ, Lun ZR, Shen J, Wang Y, Kasper LH,Lu F. Evaluation of the adjuvant effect of pidotimod on the immune protection induced by UV-attenuated *Toxoplasma gondii* in mouse models. Parasitol Res. 2013 Jun 20.

Zheng B, Lu S, Tong Q, Kong Q, Lou D. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. Vaccine. 2013 Sep 23;31(41):4578-84.

Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood. 2008 Sep 1;112(5):1557-69.

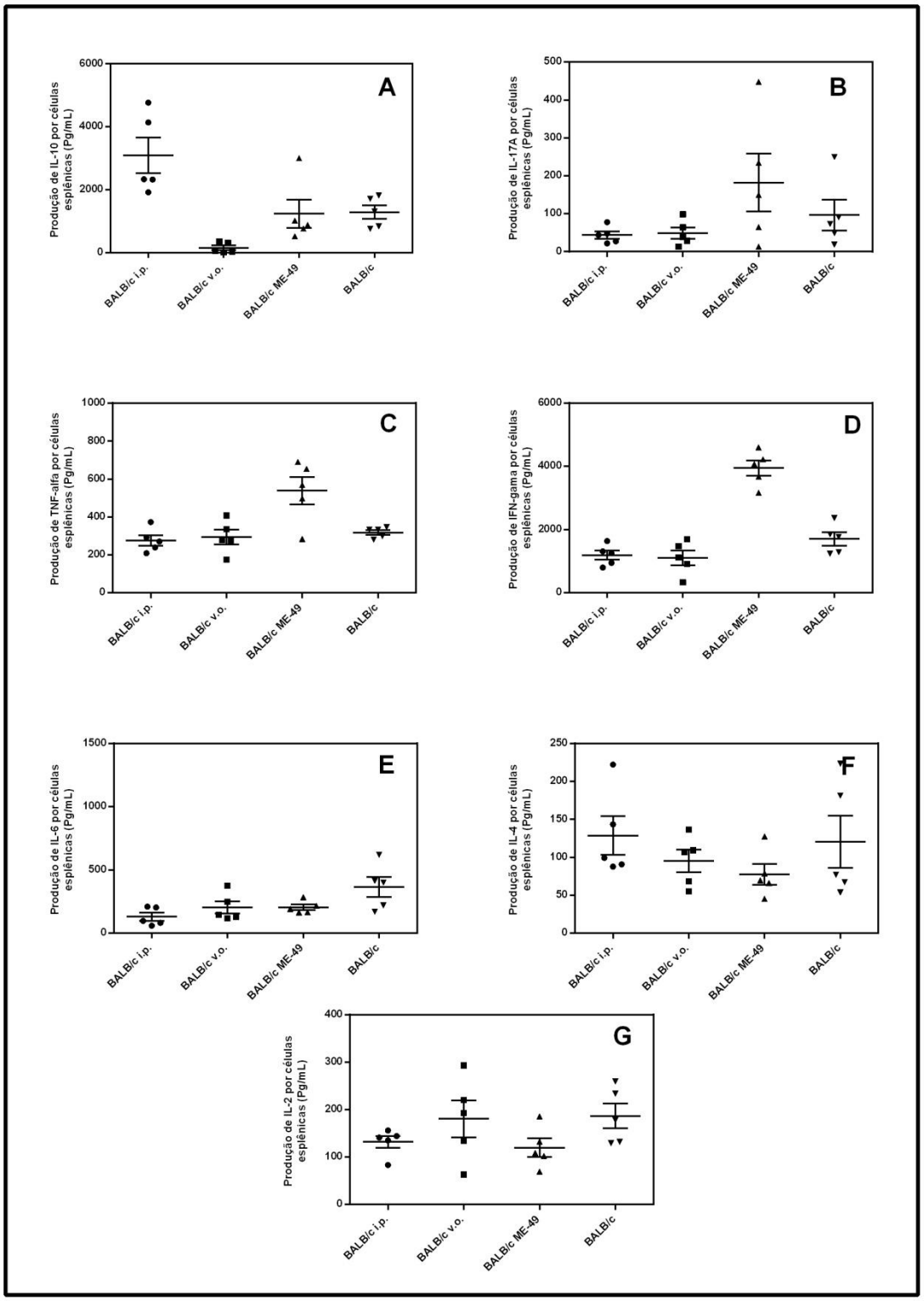
Zorgi NE, Costa A, Galisteo AJ Jr, do Nascimento N, de Andrade HF Jr. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. Immunol Lett. 2011 Aug 30;138(2):187-96.

APÊNDICE A - Correlação quantitativa preliminar entre eventos imunológicos e o grau de proteção obtido nos experimentos de desafio. Correlação de Spearman estimada para significância duplo-caudal do modelo

Evento	**Relação com a quantidade de *Toxoplasma gondii* no cérebro após desafio. Correlação de Spearman (r) e significância (p)**
Células TCD8 baço*	**r= -0,6606** **p= 0,0376**
Células TCD8 sangue periférico*	**r= -0,6727** **p= 0,0330**
IgG total 45 dias após a imunização*	**r= -0,6505** **p= 0,0417**
IgG avidez 45 dias após a imunização*	**r= -0,7356** **p= 0,0153**
IgA total 45 dias após a imunização*	**r= 0,7112** **p= 0,0211**
IgA avidez 45 dias após a imunização*	**r= 0,7234** **p= 0,0180**
IgM avidez 45 dias após a imunização**	**r= -0,7964** **p= 0,0058**
Produção de IL-10 por células esplênicas*	**r= -0,6626** **p= 0,0368**
Produção de IL-4 por células esplênicas**	**r= -0,8432** **p= 0,0022**

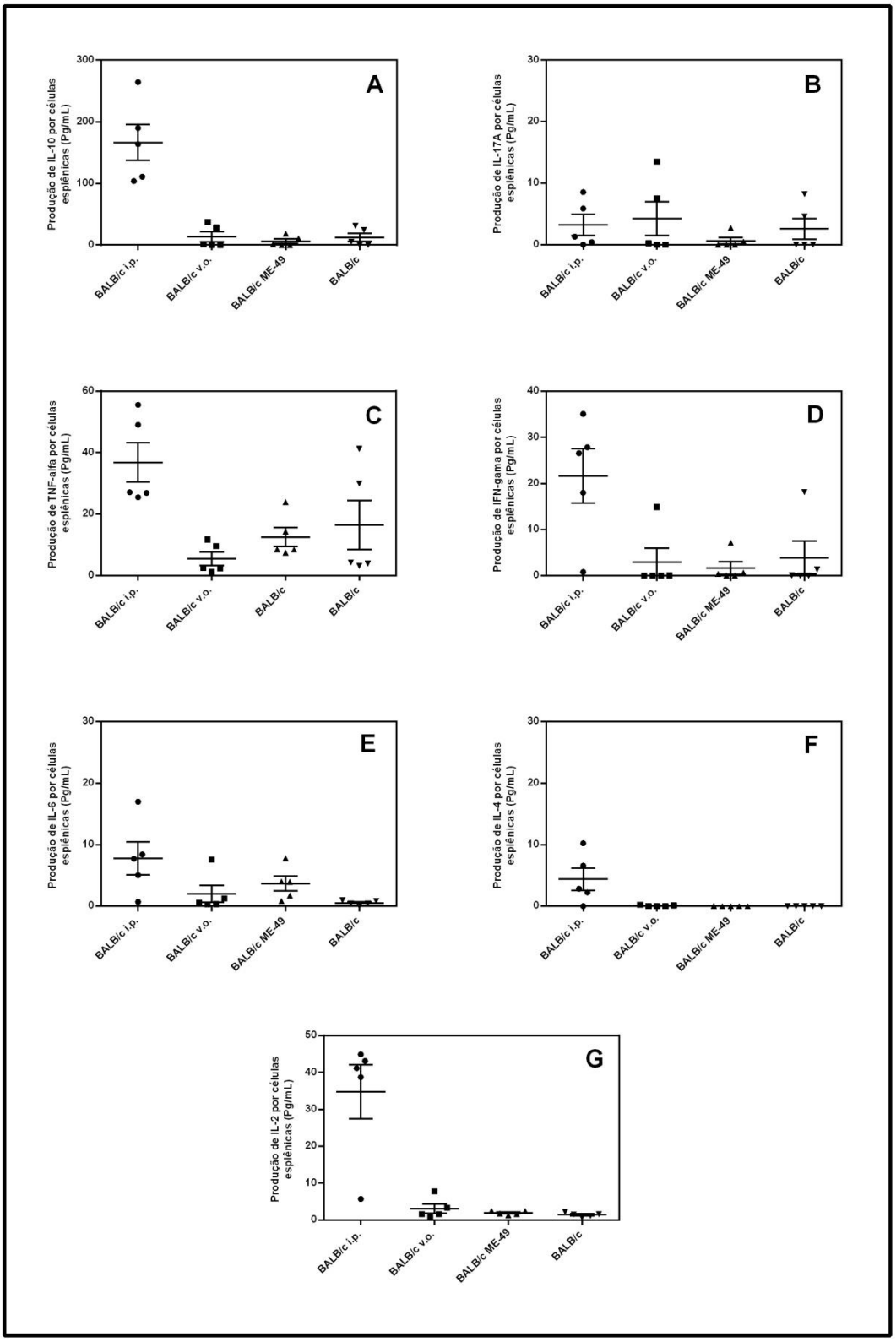
A presença de um asterisco (*p<0,05; **p<0,01) indica diferença significante quanto ao grupo controle.

APÊNDICE B - Produção de IL-10 (A), produção de IL-17-A (B), produção de TNF-alfa (C), produção de IFN-gama (D), produção de IL-6 (E), produção de IL-4 (F) e produção de IL-2 (G) por células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., estimuladas com estímulo inespecífico (ConA) após 15 dias da imunização



Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (*p<0,05; ***p<0,001) significante quanto ao grupo sem imunização. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.

APÊNCIDE C - Produção de IL-10 (A), produção de IL-17-A (B), produção de TNF-alfa (C), produção de IFN-gama (D), produção de IL-6 (E), produção de IL-4 (F) e produção de IL-2 (G) por células esplênicas de camundongos imunizados com 10^7 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados à 255Gy de Cobalto 60 por via i.p. e por v.o., sem estímulo (Basal) após 15 dias da imunização



Barras representam à média e o erro padrão da média, sendo que a presença de um asterisco indica diferença (*p<0,05; ***p<0,001) significante quanto ao grupo sem imunização. BALB/c i.p. – Camundongos BALB/c imunizados por via i.p.; BALB/c v.o. – Camundongos BALB/c imunizados por v.o.; BALB/c ME-49 – Camundongos BALB/c após 30 dias da infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; BALB/c – Camundongos BALB/c controle, sem imunização e sem infecção.