ANDREA DA COSTA

**Avaliação da imunidade e proteção induzida em
modelos experimentais por extrato solúvel de
taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiado por
⁶⁰CO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

ANDREA DA COSTA

**Avaliação da imunidade e proteção induzida em
modelos experimentais por extrato solúvel de
taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiado por
 ^{60}Co**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de
Andrade Junior

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Costa, Andrea da.

Avaliação da imunidade e proteção induzida em modelos experimentais por extrato solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiado por Cobalto-60 / Andrea da Costa. -- São Paulo, 2013.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Protozoologia.

Versão do título para o inglês: Evaluation of immunity na protection induced in experimental models by soluble extract of *Toxoplasma gondii* tachyzoites irradiated by Cobalt-60.

1. *Toxoplasma gondii* 2. Radiação ionizante 3. Anticorpos
4. Resposta imune 5. Células de memória 6. Proteção 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/SBIB0186/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andrea da Costa.

Título da Dissertação: Avaliação da imunidade e proteção induzida em modelos
experimentais por extrato solúvel de taquizoítos de
Toxoplasma gondii irradiado por Cobalto-60.

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

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 29 de fevereiro de 2012.

Ilmo (a)

Dr. Heitor Franco de Andrade Junior

(aos cuidados de Andreia da Costa)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2012/115** e intitulado "Resposta humoral induzida por proteína recombinante SAG irradiada por Cobalto-60 na toxoplasmose experimental", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Jorge Casseb

Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Prof. Dr. Jorge S.R. Casseb
Professor Doutor do IMT
LIM 56 - FMUSP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Of.CEUA.027.13

São Paulo, 29 de abril de 2013.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior
Departamento de Parasitologia - ICB/USP

Prezado Senhor,

Em atenção à sua solicitação de 23.04.13., acerca da alteração de título da licença nº 90/2011, informo que a Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB (CEUA-ICB/USP), deliberou que não há necessidade da alteração solicitada visto se tratar de linha de pesquisa onde podem ser inseridos novos estudos.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador
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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **90** nas fls. **106** 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 "*Resposta humoral e proteção induzida por proteína recombinante SAGI irradiada por Cobalto-60 na toxoplasmose experimental*" do qual participam o(s) alunos **Andréa da Costa** e os pesquisadores **S. Angel, Nanci do Nascimento, Andrés Jimenez Galisteo Jr.**, 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 **29.06.2011**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 30 de junho de 2011.

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

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

*Dedico este trabalho ao meu pai
Amadeus e a minha mãe
Josimeire, por toda força, amor,
carinho, atenção e paciência
durante todo meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.**, pela oportunidade, pela orientação, dedicação, ensinamentos críticos, elogios e por toda confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. **Andrés Jimenez Galisteo Jr.**, pelos ensinamentos, sugestões, apoio, críticas, e correções durante a realização deste e outros trabalhos;

À **Nahiara Esteves Zorgi**, pelas orientações nos ensaios de citometria, pela companhia durante todos os dias na realização deste trabalho e principalmente pelo apoio e amizade;

À **Jaqueline Polizeli Rodrigues**, pela companhia durante todos os dias na realização deste trabalho e principalmente pelo apoio e amizade;

À **Roselaine Pereira Alvim Cardoso**, pelas conversas e principalmente pela colaboração durante a realização deste trabalho;

Ao **Luciano Monteiro da Silva**, pela disposição a sempre ajudar e em todo auxílio nas compras de reagentes;

À **Solange Fernandes Ferreira dos Santos**, pelo carinho e ajuda e toda disposição em ajudar;

Aos amigos do laboratório de Protozoologia do IMTSP: **Alessandrea Krakhecke**, **Bruna Macedo**, **Camila Aparecida de Carvalho**, **Elizama Carneiro M. Bezerra**, **Janaina Baptista Alves**, **Joana Desiderato**, **Juliana Nunes Mecca**, **Lucina Regina Meireles**, **Marina Cortez Demicheli**, **Michel Rodrigues Ferreira Grillo**, **Nathaly Montagnana**, **Raíssa Char Forgoso**, **Silvia Cristina Leopoldino**, **Talita Caroline Coelho dos Santos**, **Thiago Fidelis Ferrão**, **Vanessa Rodrigues da Silva**, pela amizade, companhia, risadas e pelos momentos de descontração.

À **Laura Masami Sumita**, pelo carinho, disposição a ajudar e amizade;

À minha família **Jose Amadeus da Costa, Josimeire da Costa e Géssica da Costa**, por todo apoio e carinho;

À minha sobrinha **Maria Eduarda da Costa Guirado**, por sempre me mostrar que só um sorriso pode fazer tudo ficar mais leve;

Ao meu namorado **Andre Baptista Alves**, por todo carinho, amor, paciência e atenção durante todos os dias, obrigada por sempre me apoiar e nunca sair do meu lado mesmo nos momentos de maiores dificuldades;

Aos meus amigos, **Elton Dias, Thiago Emídio Teixeira, Leandro Emídio Teixeira, Andreia Suemi Uehara, Fabiana de Moraes Boselli**, pela amizade, carinho e apoio;

À **Carlos G. da Silveira e Elizabeth S.R. Somessari, CTR/IPEN**, por possibilitarem a irradiação das amostras utilizadas nesse projeto;

À **CAPES**, pelo apoio financeiro;

Ao **LIM49FMUSP**, pelo suporte ao projeto.

E a todos que auxiliaram na realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

À **Deus**.

“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 nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

Costa A. Avaliação da imunidade e proteção induzida em modelos experimentais por extrato solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiado por ^{60}Co [dissertação (Mestrado Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A toxoplasmose afeta 1/3 da população humana e só existe uma vacina para uso veterinária. A radiação gama altera as proteínas tornando-as mais imunogênicas, por oxidação e melhor apresentação de antígenos na ausência de adjuvantes. Irradiamos extrato solúvel de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* (AgTg), e avaliamos seu uso como vacina em camundongos BALB/c. Doses abaixo de 500Gy não afetavam e doses acima de 2000Gy destruíam o extrato, sendo que animais imunizados com extrato irradiado a 1000, 1500 e 2000Gy tinham mais IgG específica de maior avidéz, comparado ao AgTg nativo ($p < 0.05$). Animais imunizados pelo AgTg 1500Gy tiveram aumento da proliferação de esplenócitos, fenotipados como $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ e de linfócitos B, comparados com animais imunizados pelo AgTg nativo. Animais imunizados pelo AgTg 1500Gy após desafio com cepa ME-49 cistogênica apresentaram menor número de cistos cerebrais e maior sobrevivência pós desafio com cepa virulenta RH. A radiação ionizante em extratos de *T. gondii* aumenta a resposta imune e a memória imunológica na ausência de adjuvantes.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Radiação ionizante. Anticorpos. Resposta imune. Células de memória. Proteção.

ABSTRACT

Costa A. Evaluation of immunity and protection induced in experimental models by soluble extract of *Toxoplasma gondii* tachyzoites irradiated by ^{60}Co [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Toxoplasmosis affects 1/3 of the human population and only a vaccine for veterinary use. Gamma radiation alters the proteins making them more immunogenic by oxidation and better antigen presentation in the absence of adjuvants. Radiate soluble extract of RH strain tachyzoites of *T. gondii* (AgTg), and evaluate its use as a vaccine in BALB/c. Doses below 500Gy not affected and destroyed 2000Gy doses above extract, whereas animals immunized with irradiated extract at 1000, 1500 and 2000Gy had more of specific IgG avidity, compared to native AgTg ($p < 0,05$). AgTg 1500GY the immunized animals had increased proliferation of splenocytes, phenotyped as $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ and B-lymphocytes immunized animals compared to the native AgTg. Animals immunized by AgTg 1500GY after challenge with strain ME-49 cystogenic showed lower number of brain cysts and greater survival after challenge with virulent RH. Ionizing radiation in extracts of *T. gondii* increases the immune response and immune memory in the absence of adjuvants.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Ionizing radiation. Antibodies. Immune response. Memory cells. Protection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> e suas formas de infecção humana....	30
Figura 2	Estratégia de análise da proliferação celular esplênica de células T <i>helper</i> , células T citotóxicas e linfócitos B com a marcação de CFSE.....	52
Figura 3	Microscopia de exsudato peritoneal de camundongos Swiss infectados com taquizoítos da cepa RH de <i>T. gondii</i> , após 5 dias de infecção.....	54
Figura 4	Quantificação de proteínas de taquizoítos de <i>T. gondii</i> obtidas após purificação utilizando SEPHADEX® G-25 por método Bradford.....	55
Figura 5	Perfil eletroforético de antígeno solúvel de taquizoítos de <i>T. gondii</i> purificado em SEPHADEX® G-25.....	56
Figura 6	Perfil eletroforético das amostras de antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> irradiadas a diferentes doses de Cobalto-60.....	57
Figura 7	Imunogenicidade do AgTg irradiado a diferentes doses de ⁶⁰ CO e AgTg nativo por ELISA.....	58
Figura 8	Avaliação da imunogenicidade de AgTg irradiado a diferentes doses de ⁶⁰ CO e AgTg nativo.....	60
Figura 9	Avaliação da antigenicidade do soro de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a diferentes doses de ⁶⁰ CO ou AgTg nativo por Dot-blot.....	61
Figura 10	Evolução da produção de anticorpos IgG anti <i>T. gondii</i> , detectadas em uma única diluição (1/100), em grupos de 04 camundongos BALB/c imunizados com antígeno de <i>T. gondii</i> submetido a diferentes doses de radiação de Cobalto-60.....	62
Figura 11	Curva linear da evolução da produção de anticorpos IgG anti <i>T.gondii</i>	63
Figura 12	Determinação e avidéz de IgG induzidos por antígeno de <i>T.gondii</i> submetido a diferentes doses de irradiação de ⁶⁰ CO, 15 dias após a 3ª dose quinzenal.....	64

Figura 13	Western Blot utilizando soro de camundongos BALB/c imunizados pelo AgTg irradiado a diferentes doses de ^{60}CO	65
Figura 14	Perfil eletroforético das amostras de AgTg nativo e AgTg irradiado a 1500Gy de ^{60}CO	66
Figura 15	Western Blot utilizando soro de camundongos BALB/c imunizados pelo antígeno de <i>T. gondii</i> irradiado a 1500Gy de ^{60}CO	68
Figura 16	Avaliação da antigenicidade do soro de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado 1500Gy de ^{60}CO ou AgTg nativo por Dot-blot.....	69
Figura 17	Resposta imune humoral sérica de camundongos BALB/c imunizados via subcutânea (3doses) pelo AgTG irradiado a 1500Gy de ^{60}CO ou antígeno nativo.....	70
Figura 18	Maturação da resposta imune humoral em animais imunizados com antígeno total de <i>T.gondii</i> nativo ou irradiado a 1500Gy, 15 dias após 03 imunizações, mostrando maior produção de anticorpos IgG por extrato irradiado.....	72
Figura 19	Número de cistos cerebrais identificados por microscopia após 30 dias do desafio oral com 10 cistos de ME-49 em camundongos imunizados pelo AgTg nativo ou AgTg irradiado a 1500Gy de ^{60}CO	73
Figura 20	Quantificação por Real-Time PCR de DNA de <i>T. gondii</i> em cérebros de camundongos BALB/c imunizados pelo AgTg irradiado a 1500Gy ou AgTg nativo e desafiados por 10 cistos da cepa ME-49.....	74
Figura 21	Sobrevivência de camundongos inoculados BALB/c previamente imunizados e desafiados por 10^3 taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa RH tipo I.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência do primer utilizado para realização do Real-Time PCR.....	48
Tabela 2	Representação da proliferação de células esplênicas de camundongos BALB/c controle, camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg nativo, camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg 1500Gy e camundongos infectados pela cepa ME-49 marcados com Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) e estimuladas com extrato protéico de <i>T. gondii</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

⁶⁰CO	Cobalto-60
AgTg	Antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (Acquired immunodeficiency syndrome)
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
CFSE	Ester de succimida de carboxifluoresceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DOC	Desoxicolato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imuno-enzimático de fase sólida (Enzyme Linked Immunoassorbent Assay)
GRA	Proteínas dos Grânulos densos (Dense Granule Proteins)
Gy	Gray
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (Human immunodeficiency vírus)
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INF-γ	Interferon-gama
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIC	Proteínas dos Micronemas (Microneme Proteins)
NaN₃	Azida Sódica

NaCl	Cloreto de Sódio
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
O₂	Oxigênio
OPD	orto-fenileno diamina
PBS	Salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline)
PBST	Salina tamponada com fosfato com Tween 20
PBSTL	Salina tamponada com fosfato, Tween 20 e leite desnatado
PMSF	Fluoreto <i>de</i> fenilmetanosulfonato
RON	Proteínas do pescoço da roptria (Ropthry Neck Proteins)
ROP	Proteínas das roptrias (Ropthry Proteins)
SAG	Antígeno principal de superfície (Surface antigen)
Th1	Resposta T do tipo I
Th2	Resposta T do tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa (Tumor Necrosis Fator)
Tris	Tris hidroximetilaminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Gerais.....	25
2.2	Específicos.....	25
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
3.1	<i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	26
3.1.1	<i>Ciclo de vida</i>	29
3.1.2	<i>Invasão celular e imunidade na toxoplasmose</i>	30
3.1.3	<i>Vacinas para toxoplasmose</i>	32
3.2	Resposta imune induzida por vacinas.....	33
3.2.1	Adjuvantes.....	36
3.3	Radiação Ionizante.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Parasitas.....	39
4.1.1	<i>Cepas RH virulentas (tipo I)</i>	39
4.1.2	<i>Cepas ME-49 cistogênica (tipo II)</i>	39
4.2	Animais experimentais.....	40
4.3	Obtenção do antígeno de extrato total de <i>T. gondii</i>	40
4.4	Obtenção do antígeno solúvel de taquizoítos de <i>T.gondii</i> (AgTg).....	40
4.5	Irradiação do AgTg em fonte homogênea de Cobalto-60 (⁶⁰ CO).....	41
4.6	Caracterização das proteínas do AgTg nativas ou irradiadas por ⁶⁰ CO.....	42
4.6.1	<i>SDS-PAGE</i>	42
4.6.2	<i>Quantificação de proteínas por densitometria digital</i>	42
4.7	Imunização dos animais.....	43
4.8	Obtenção das amostras de soro dos animais imunizados.....	43
4.9	<i>Preparo de membranas transferidas com antígeno de extrato total de T. gondii para os ensaios de antigenicidade (Western Blot)</i>	43
4.9.1	<i>Preparo de membranas transferidas com AgTg irradiados e</i>	

nativo para ensaios de imunogenicidade (Western Blot).....	44
4.10 Dot-Blot.....	45
4.11 Ensaio de imunogenicidade para detecção do reconhecimento de anticorpos específicos por AgTg irradiado a diferentes doses de ⁶⁰ CO (ELISA).....	45
4.12 ELISA para detecção de anticorpos IgG séricos específicos anti <i>T. gondii</i> no soro de camundongos imunizados por AgTg nativo ou irradiado a diferentes doses de ⁶⁰ CO.....	46
4.13 Detecção da avidéz de anticorpos específicos IgG séricos anti <i>T. gondii</i> por ELISA.....	47
4.14 Quantificação de cistos cerebrais da cepa ME-49 por Real time PCR.....	47
4.14.1 Extração de DNA.....	47
4.14.2 Confeção dos primers.....	48
4.14.3 Condições da reação e análise dos resultados.....	48
4.15 Desafio de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg nativo ou irradiado por cepa RH virulenta (tipo I).....	48
4.16 Desafio dos camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg nativo ou irradiado utilizando cepa ME-49 (tipo II).....	49
4.17 Citometria de Fluxo – Ensaios de CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester).....	49
4.17.1 Cultura celular de células esplênicas.....	49
4.17.2 Marcação com CFSE.....	50
4.17.3 Marcação intracelular.....	51
4.17.4 Estratégia de Análise.....	51
4.18 Análise Estatística.....	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Produção de taquizoítos purificados da cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	54
5.2 Irradiação e análise eletroforética de amostras de AgTg	

	irradiadas a diferentes doses de Cobalto-60: 500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy.....	56
5.3	Avaliação da imunogenicidade de AgTg nativo ou irradiado por diferentes doses de Cobalto-60 (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) por ELISA e Western Blot.....	58
5.4	Western Blot utilizando AgTg irradiado a diferentes doses de ⁶⁰ CO.....	59
5.5	Avaliação da antigenicidade de AgTg nativo ou irradiado por diferentes doses de 60-Cobalto (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) por Dot –blot.....	60
5.6	Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado por diferentes doses de Cobalto-60 (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) ou antígeno nativo.....	61
5.7	Determinação e avidéz de IgG induzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com antígeno de <i>T. gondii</i> irradiados por diferentes doses de ⁶⁰ CO (500 Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy).....	63
5.8	Identificações da reatividade específica de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com antígeno de <i>T. gondii</i> irradiados a diferentes doses de Cobalto-60 (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) por Western Blot.....	64
5.9	Irradiação e análise eletroforética das amostras AgTg irradiado a 1500Gy de ⁶⁰ CO.....	65
5.10	Reatividade específica de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy de Cobalto-60 por Western Blot.....	67
5.11	Análise da antigenicidade do extrato de <i>T. gondii</i> irradiado a 1500Gy de ⁶⁰ CO por Dot blot.....	68
5.12	Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c	

imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy de ^{60}CO	68
5.13. Determinação da avidéz de IgG induzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy de ^{60}CO	71
5.14. Proteção dos camundongos imunizados por via subcutânea com antígeno de <i>T. gondii</i> irradiado a 1500Gy por ^{60}CO , após desafio com cistos da cepa ME-49.....	72
5.14.1. Contagem de cistos cerebrais.....	72
5.14.2. Real Time PCR.....	73
5.15. Proteção de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy por ^{60}CO , após desafio com cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	74
5.16. Proliferação celular de linfócitos <i>T helper</i> (CD3 ⁺ CD4 ⁺), linfócitos T citotóxicos (CD3 ⁺ CD8 ⁺) e linfócitos B (CD19 ⁺) de camundongos BALB/c imunizados com AgTg nativo e irradiado a 1500Gy de ^{60}CO por via subcutânea.....	75
6. DISCUSSÃO.....	78
7. CONCLUSÕES.....	89
7.1 Gerais.....	89
7.2 Específicas.....	89
REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença amplamente distribuída pelo mundo, causada pelo protozoário Apicomplexa *Toxoplasma gondii* (Dubey, 2009). Estima-se que um terço da população mundial tenha anticorpos para a infecção e assim seja portador de cistos teciduais (Machado et al., 2010). Em suas formas mais graves, a toxoplasmose pode causar doenças oculares e congênitas, causando morte em imuno comprometidos e doença sequelar em crianças com infecção congênita, com cegueira e deficiência mental (Clumeck et al., 1984; Kravetz, 2013; Lu et al., 2003; Rorman et al., 2006). O parasita é cosmopolita e sua forma de transmissão está associada basicamente ao carnivorismo a partir da ingestão de oocistos liberados de seus hospedeiros definitivos, os felinos. A ingestão de proteínas é essencial para a nossa espécie, e a proteína animal é a base nutricional mais importante na maioria das regiões. A qualidade da carne ingerida é de suma importância e assim é necessário adquirir formas de prevenir a transmissão a partir de da qualificação de rebanhos de corte e proteção das pastagens (Jones, Dubey, 2012). Outra forma de transmissão comum em humanos são os oocistos presentes em águas contaminadas ou verduras que contenham o agente aderido (Dubey et al., 1998). A realização de um bom controle sanitário de nascentes, reservatórios e sistemas de filtração de água seria uma alternativa eficiente visto que apenas o cloro não é capaz de eliminar o agente. Sendo assim, nas duas formas de transmissão é essencial que se diminua a carga de oocistos no ambiente. A vacinação de felinos seria uma forma eficaz para interromper esse ciclo de transmissão, diminuindo a contaminação das pastagens e a carga infectante em águas e verduras.

A toxoplasmose não se caracteriza como uma doença letal para humanos ou felinos, sendo considerada benigna na grande maioria dos infectados (Yap, Sher, 1999). Com a evolução das sociedades humanas, doenças como a toxoplasmose passaram a assumir grande relevância nos gastos individuais com saúde, pois influenciam diretamente na sobrevivência das famílias. Assim, a pequena chance de se adquirir toxoplasmose ocular congênita ou imunossupressões passou a ser considerada como um fator de risco na sociedade moderna, levando as pessoas a se preocuparem mais com um padrão de vida saudável (Santos et al., 2000).

Uma possibilidade para se controlar a transmissão desses parasitas/ protozoários seriam as vacinas. No entanto, as vacinas destinadas a organismos nucleados são raras e pouco eficientes. Diversas tentativas têm sido realizadas para a sua produção tanto na forma de vacinas para infecções causadas por fungos quanto àquelas voltadas para o controle de graves endemias causadas por protozoários - como a malária e a leishmaniose. Sabe-se que para uso humano somente uma vacina foi aprovada para ser aplicada contra organismos eucariotos, por meio da utilização de esporozoítos de *Plasmodium falciparum* irradiados (Schwartz et al., 2012). Por se tratarem de agentes que apresentam cultivo árduo e instável, com ciclo de vida complexo, a solução encontrada foi a produção de vacinas com imunógenos recombinantes ou sintéticos. No entanto, esses produtos mostraram-se pouco eficientes, sendo necessário o uso de adjuvantes. Ainda assim, os resultados obtidos foram irregulares, com proteção próxima a 50% em estudos de grande escala. Nessa perspectiva o *Toxoplasma gondii* é um protozoário ideal para os estudos de vacina visto que, a complexidade do seu ciclo de vida apresenta várias formas do agente com diferentes velocidades de crescimento (Dubey, 2009). Por persistirem no hospedeiro por anos induzem imunidade ao mesmo tempo em que protegem indiretamente de novas infecções (Yap, Sher, 1999). Outro fator que contribui para sua utilização, segundo Frenkel e Ambroise-Thomas (1997), é que seu rápido crescimento – tanto em modelos experimentais como em células em cultura, com produção de antígenos em massa – apresenta estabilidade genômica com comparações entre diversas linhagens do protozoário.

Como é do mesmo filo que o *Plasmodium*, a produção experimental de vacinas para a toxoplasmose por radiação também já foi pesquisada com sucesso, com estudos sobre a imunidade humoral e celular e sem o uso de adjuvantes (Zorgi et al., 2011; Hiramoto et al., 2002). Adjuvantes são misturas de produtos químicos na sua maioria lipofílicos que adicionado a vacinas facilitam a cooperação da resposta imune, em geral por causar inflamação aguda local (Andrew, Lee, 2013). O uso de adjuvantes é bastante restrito em vacina humanas pelo seu desencadeamento de doenças autoimunes ou por reações locais no sítio de administração (Mount et al., 2013). A radiação ionizante age de diversas formas sobre os agentes além do seu efeito esterilizante também foi associada ao aprimoramento de imunógenos em hanseníase (Adams et al., 2000) ou em produção de antisseros contra venenos (Nascimento et al., 1996). Sabe-se que o efeito da

radiação sobre proteínas em solução é extremamente dependente dos efeitos da radiólise da água, o que causa a liberação de fatores oxidantes ou formação de pontes moleculares (Moon, Song, 2000). O estudo molecular mostrou que proteínas irradiadas eram reconhecidas por receptores *Scavengers* de macrófagos (Cardi et al., 1998b), que estão associados à captação de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APC) e que essas proteínas eram internalizadas por estas células na ausência de adjuvantes ou moléculas adicionadas aos antígenos. Este fenômeno poderia resultar em aprimoramento da apresentação de antígenos e melhor resposta imune, além de permitir a exclusão do uso de adjuvantes, o que é importante em vacinas para uso humano (Riese et al., 2013).

Diante dessas informações, propusemos estudar antígeno de *T. gondii* processados pela radiação ionizante como forma de uma vacina sem o uso de adjuvantes. Inicialmente tínhamos como objetivo produzir uma proteína recombinante do agente para aprimorar suas características a partir da radiação. Durante o exame de qualificação, a produção do antígeno recombinante foi considerada periférica ao projeto, que na realidade tinha como objetivo observar o efeito da radiação sobre um antígeno disponível do agente, a capacidade de induzir respostas imunes e analisar a proteção induzida a partir de desafios com agente viáveis em animais experimentais. Nesse contexto, decidimos estudar o efeito da radiação sobre o extrato antigênico de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* e avaliar sua capacidade de induzir imunidade e proteção em modelos utilizando camundongos BALB/c.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Avaliar o efeito da radiação ionizante por raios γ de Cobalto-60 (^{60}Co) sobre o extrato antigênico de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* e a sua capacidade de induzir resposta imune e proteção em camundongos imunizados.

2.2 Específicos

- Produzir antígeno a partir de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* purificado;
- Avaliar os efeitos da radiação γ de ^{60}Co sob o antígeno purificado a partir da imunogenicidade e antigenicidade.
- Em camundongos imunizados pelo antígeno irradiado por ^{60}Co avaliar:
 - A produção e afinidade de anticorpos IgG específicos anti-*T.gondii* no soro;
 - Avaliar a proliferação celular de células esplênicas e de células B de camundongos BALB/c imunizados pelo antígeno solúvel de taquizoítos de *T. gondii* irradiado a 1500Gy de raios γ de ^{60}Co na presença de antígeno de extrato total de *T. gondii*;
 - A proteção induzida em animais imunizados e desafiados por cepas RH (tipo I) e ME-49 (tipo II) de *T. gondii*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infecção amplamente distribuída pelo mundo, estima-se que um terço da população mundial tenha anticorpos para a infecção, dados sugerem que 70% da população mundial está exposta a doença em alguma fase da vida (Wu et al., 2009). *T. gondii* é um patógeno de caráter oportunista capaz de infectar, invadir e se multiplicar no interior de qualquer célula nucleada. A toxoplasmose pode ser adquirida pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados, que são eliminados juntamente com as fezes dos felinos e em carnes mal cozidas contendo cistos teciduais (Robinson et al., 2004). Historicamente a ingestão de cistos teciduais de *T. gondii* era considerada a maior rota de transmissão em humanos, mas a melhoria dos manejos de criação reduziu a probabilidade de animais infectados, no entanto a prevalência de *T. gondii* em felinos permanece alta, e eventuais casos de transmissão pela água ou solos contaminados vem sendo documentados (Crawford et al., 2010). Os membros da família dos felídeos são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, e em seu intestino que ocorre a replicação do parasita, que resulta na produção de oocistos. Durante a infecção aguda, milhões de oocistos são liberados no ambiente a partir das fezes de gatos. Após a esporulação os oocistos são liberados contendo esporozoítos que poderam ser ingeridos por mamíferos, incluindo o homem dando lugar a fase de taquizoítos (Dubey et al., 1998). Os taquizoítos são células polarizadas de forma alongada que possuem estruturas como anéis polares, conóides, róptrias e micronemas formando o complexo apical, e como se tratam de células eucarióticas, apresentam retículo endoplasmático e Complexo de Golgi compartimentado contendo estruturas secretoras distintas presentes exclusivamente em *T. gondii*, como grânulos densos, róptrias e micronemas (Wanderley et al., 2010).

Na maioria dos adultos a toxoplasmose é assintomática e pode variar com a condição imunológica do indivíduo podendo ser fatal em pacientes imunocomprometidos e em crianças congenitamente infectadas (Wanderley et al., 2010). A gravidade da infecção congênita depende do estágio da gravidez podendo ocasionar abortos espontâneos, doenças neurológicas graves e cegueira. Em

pacientes imunocomprometidos a toxoplasmose é responsável pela reativação da infecção latente (Passos et al., 2000).

Em países como os EUA, cerca de 400 a 4000 casos de toxoplasmose congênita foram documentados, enquanto em países europeus como França e Áustria estima-se que a cada 1000 nascimentos 3 a 4 nascimentos sejam afetados pela toxoplasmose congênita (Gras et al., 2005; Joynson, 1992). No Estado de São Paulo, estima-se que cerca de 230 a 300 crianças sejam infectadas por ano (Guimarães et al., 1993).

Em pacientes portadores da AIDS, o parasita desenvolve uma série de sintomas, sendo encefalite o mais frequente, a rápida multiplicação dos taquizoítos resulta na destruição de tecidos neurais, nesses pacientes pode ocorrer a reativação da infecção pela presença de cistos latentes, que vão liberar bradizoítos, que se transformarão em taquizoítos levando a um quadro grave da infecção (principalmente lesões cerebral. Na África, 50% dos indivíduos portadores de AIDS desenvolvem encefalite relacionada a toxoplasmose (Clumeck et al., 1984). Nos EUA, cerca de 20% a 25% dos pacientes portadores de AIDS, desenvolvem a doença e apresentam algum agravante (Rothova, 2003). A literatura registra que nos anos de 1988 e 1991 em São Paulo, 21% a 46% dos casos de encefalite em pacientes com AIDS estavam relacionadas a toxoplasmose, levando a crer que a toxoplasmose está relacionada as principais causas de morte em pacientes portadores da doença, sendo responsável por 12,2% dos casos (Santos et al., 2000).

Os índices de prevalências variam entre os países e até mesmo entre as diferentes regiões, estando relacionado com as diferenças de hábitos alimentares ou estilos de vida. Estima-se que 20% da população de Londres sejam soropositivas para a infecção, enquanto em Paris a soroprevalência alcança 73% (Machado et al., 2010). Em países tropicais como Colômbia e Venezuela a prevalência é maior em relação a locais áridos ou regiões frias. Em regiões com maior altitude a prevalência é menor comparada a regiões sob o nível do mar (Meerburg, Kijlstra, 2009). No Brasil, estima-se que 60% da população adulta da Grande São Paulo seja soropositiva para o *T. gondii* (Santos et al., 2000), porém esses índices são diferentes quando analisamos a população do Norte e Sul do país, devido as diferenças alimentares (Santos et al., 2000). A prevalência da infecção vem sendo estudada desde regiões como Amazonas até a Região Sul do país, verificando que

a soroprevalência alcança de 50% a 83%, e que esse aumento também varia de acordo com idade, nível sócio cultural e consumo de água não tratada. Estudos demonstraram a prevalência da infecção em 5 populações diferentes na região Amazônica, variando de 56,2% a 73,9%, e um estudo realizado com 3 diferentes populações indígenas brasileiras mostra prevalência de 55,6% a 80,4% (Sobral et al., 2005). A baixa prevalência de toxoplasmose em locais onde não haja a presença de felinos demonstra o papel dos oocistos na epidemiologia da doença (Dubbey, 1998). A soropositividade para toxoplasmose aumenta com a idade, na infância a prevalência é após 4 anos de idade e varia com a região. Na América Latina a prevalência para toxoplasmose pode variar de 40% a 70% (Machado et al., 2010).

Animais destinados ao consumo humano quando atingidos pela toxoplasmose, além de servirem como fontes de contaminação, também representam prejuízos econômicos aos seus criadores, devido a abortos e mortes neonatais (Buxton, 1998). Estima-se no Uruguai perda de 1,4-3,9% dos ovinos em fase gestacional, com um prejuízo em torno de US\$ 1,4-4,7 milhões de dólares (Freyre et al., 1999). Estudos apontam o problema da presença do parasita em animais destinados ao consumo humano no Brasil, cerca de 9% dos suínos (Suaréz et al., 2003), 11% dos bovinos, 17% dos caprinos e 31% dos ovinos, apresentam positividade para *T. gondii* (Meireles, 2001). Isso também se demonstra em outros países como na Holanda, onde 30,9% dos suínos e 38,5% dos ovinos no Uruguai apresentam a infecção, mostrando a importância do consumo de carne como uma das fontes de contaminação humana (Meerburg, Kijlstra, 2006). Outra forma que vem sendo apontada é contaminação por leite e seus derivados, estudos apontam que os parasitas de *T. gondii* permanecem viáveis por até 20 dias no leite a 4º C (Hiramoto et al., 2001).

A soroprevalência de *T. gondii* em ovinos em países europeus alcançam 92%, já que a carne de cordeiro crua e mal cozida é considerada uma iguaria, sendo assim uma importante fonte de infecção nos países. Outra forma de contaminação via ovinos que vem sendo documentada é pela ingestão de leite, alcançando 3,4 % dos casos de infecção (Fusco et al., 2007). Quando se trata da prevalência da infecção em caprinos, que alcança 77%, estudos demonstram que este dado pode estar relacionado com a presença de cistos no ambiente, os ruminantes são uma importante fonte de carne e leite em muitos países subdesenvolvidos (Kijlstra, Jongert, 2008). Outro grupo de animais utilizados para consumo que também podem

se apresentar como fonte de contaminação são os das aves. A soroprevalência em frangos alcança até 65%, estudos demonstraram que em países em desenvolvimento os casos alcançam até 91% de aves positivas para a infecção (Lehmann et al., 2006).

3.1.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *T. gondii* é um ciclo complexo e recentemente compreendido, composto por duas fases, assexuada e sexuada, sendo que a fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários, mamíferos (incluindo o homem) ou aves. Nessa fase há um rápido crescimento do parasita no interior celular na forma de taquizoítos que vão infectar e multiplicar-se em todas as células nucleadas do hospedeiro, e liberados na corrente sanguínea se espalhando pelo corpo desenvolvendo uma infecção aguda. Na resposta imune normal a transformação do taquizoítos em cisto formando bradizoítos caracteriza a fase aguda e estabelece a fase crônica da infecção. Bradizoítos se diferem de taquizoítos pela sua taxa de crescimento lento e algumas proteínas distintas que neles se expressam. Os cistos se formam principalmente em tecidos neurais e musculares, e podem persistir inativados no corpo por algum tempo, em pacientes imunodeprimidos a liberação dos cistos de dentro do bradizoítos pode ocasionar encefalite aguda (Dubey et al., 1998; Rorman et al., 2006).

A fase sexuada ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos, que são os felinos. Quando os bradizoítos são ingeridos pelos felinos há uma série de transformações que ocorrem no epitélio do intestino delgado do hospedeiro, e assim milhares de oocistos esporulados são liberados nas fezes do gato. Sob algumas condições ambientais os oocistos podem esporular em um período de três semanas. Nas células epiteliais do intestino se inicia a gametogênese, após o ciclo assexuado o gameta feminino (macrogametócito) nas células epiteliais e o gameta masculino (microgametócito) produzem de 10 a 21 microgametas biflagelados que saem para o meio externo fertilizando o macrogametócito. A fecundação dá origem aos oócitos imaturos liberados no meio ambiente pelas fezes dos felinos. No meio externo os oocistos sofrem a esporulação o que resulta na formação de dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um. Os oocistos são resistentes, sobrevivendo meses ou até um ano em condições ambientais. Os oocistos podem se espalhar no meio ambiente contaminando água, solo, alimentos e herbívoros que venham a se alimentar de

vegetais infectados (Dubey et al., 1998; Rorman et al., 2006). Outras formas de contaminação da toxoplasmose são por transfusões sanguíneas, transplante de órgão contendo o agente ou acidentes laboratoriais (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida de *T. gondii* e suas formas de infecção humana. Fonte: Galisteo Jr, 2004.

3.1.2 Invasão celular e imunidade na toxoplasmose

O processo de invasão ocorre quando os taquizoítos entram em contato com a célula hospedeira. Há uma reorientação do parasita que se posiciona perpendicularmente à superfície celular através de seu polo apical. Assim que ele se adere a superfície celular hospedeira há secreções de proteína dos micronemas e rôptrias (Drubremetz et al., 1998). Após a invasão do parasita na célula hospedeira ocorre a formação do vacúolo parasitóforo que evita fusões com elementos de vias celulares da célula hospedeira para que não aconteça fusões aos lisossomos (Mordue et al., 1999). No momento de sua adesão após a invasão a parasita secreta a partir das rôptrias vesículas que irão se fundir com a membrana do vacúolo (Hakansson et al., 2001).

O *T. gondii* se pode ser caracterizado como um excelente imunógeno que produz uma resposta imune inata e adaptativa. É capaz de desencadear uma ativação não específica de macrófagos e células *natural killer* (NK), esta ativação limita a proliferação do parasita. Em camundongos, a ativação de macrófagos ocorre pela produção de IFN- γ na presença de TNF- α dando origem a uma atividade citotóxica dos macrófagos contra o *T. gondii* (Sibley et al., 1993). A inibição da sua replicação e sua destruição é resultado de mecanismos efetores como mecanismos oxidativos; não oxidativos pela produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados por IFN- γ , também envolvendo NO durante a fase crônica inibindo a proliferação cerebral do parasita (Schluter et al., 1999).

Durante a fase tardia da infecção a combinação da ação de células NK e macrófagos ativados por IFN- γ exerce a imunidade inata restrita ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Neste estágio linhages de macrófagos diferenciam-se em células apresentadoras de antígenos (APC). Neutrófilos, eosinófilos e mastócitos também agem no local da infecção estando envolvidos com a resposta imune inata através da produção de fatores pró-inflamatórios como a IL-12 (Bout et al., 1999). Células como os fibroblastos, células epiteliais e endoteliais também são capazes de diminuir a proliferação do parasita a partir de mecanismos ferro dependentes, iNOS, IFN- γ e TNF- α (Yap, Sher, 1999).

Células efetoras estão envolvidas na resistência a infecção por *T. gondii*, por isso exercem suas funções através de atividades citotóxicas e ou/ secreção de citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (Hunter et al., 1994). Linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ são as principais células envolvidas na resistência do hospedeiro a infecção (Gazzinell et al., 1991). Em camundongos linfócitos T CD4⁺ maduros são divididos em subpopulações Th1 e Th2. Esta divisão é baseada de acordo com a citocina secretada após estímulo. Células Th1 produzem IL-2 e IFN- γ e células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Linfócitos T CD4⁺ desenvolvem resistência durante a fase inicial da doença e imunidade durante a vacinação (Araújo, 1991). A resistência é relacionada a resposta Th1 induzida pelo IFN- γ e pela IL-12, ativando células NK e macrófagos (Denkers et al., 1998). Contudo o controle da infecção por *T. gondii* é relacionado ao resultado da ação entre linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺. Linfócitos TCD8⁺ são ativados por proteínas da superfície do parasita (Kasper et al., 1992), e parece ser essencial durante a fase ativa da infecção sendo relacionado a imunidade protetora (Denker et al., 1998). Linfócitos TCD8⁺ ativados pela IL-2

excretados por células T CD4⁺ que exercem uma atividade citotóxica contra taquizoítos ou células infectadas pelo *T. gondii* (Subauste et al., 1991).

A produção de IFN- γ é encontrada em humanos na toxoplasmose aguda e em recém-nascidos infectados durante a gravidez, em camundongos, a secreção de IFN- γ aumenta a atividade fagocitária de macrófagos e a atividade citotóxica de linfócitos TCD8⁺ (Ely et al., 1999). Entretanto o IFN- γ provoca a conversão de taquizoítos em bradizoítos ao mesmo tempo em que impede sua ruptura (Suzuki, Remington, 1999). A IL-12 desempenha um papel importante na toxoplasmose, durante a fase aguda da infecção, ativando IFN- γ por células NK e células T CD4⁺ e TCD8⁺. A IL-12 também é essencial durante a fase crônica da infecção mantendo a resposta imune durante muito tempo (Hunter et al., 1994). Estudos utilizando a combinação de IL-12 e a proteína recombinante SAG1 demonstram resposta imune do tipo Th1 com alta produção de IFN- γ (Letscher-Bru et al., 1998). O TNF- α exerce a ativação de macrófagos e inibição da replicação do parasita associado ao IFN- γ . Esta ação é observada em camundongos, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. O TNF- α assim como a IL-12, também estimula a produção IFN- γ por células NK, que desempenham um papel crucial no início da resposta inata durante a toxoplasmose (Yamamoto et al., 2000).

3.1.3 Vacinas para Toxoplasmose

Atualmente a única vacina comercial para toxoplasmose é a utilizada na Nova Zelândia para imunização de ovinos, produzida a partir de taquizoítos da cepa S-48 (Buxton, 1993). A cepa TS-4 também foi utilizada para imunização de suínos mostrando proteção após desafio com oocistos por via oral (Pinckney et al., 1994). Estudos recentes mostraram que ovinos vacinados pela cepa RH mutante de *T. gondii* reduziu abortos (Mevelc et al., 2010). Modelos vacinais utilizando cepas atenuadas não apresentam grande eficiência além de demonstrarem recuperação da virulência em animais jovens, podendo promover a infecção com formação de cistos teciduais (Alexander et al., 1996). Imunizações com parasitas de *T. gondii* vivos atenuados demonstraram uma melhor proteção quando comparados a taquizoítos inativados independentes do adjuvante usado com exceção do desafio utilizando a cepa mutante TS-1 (Waldeland, Frenkel, 1983). Há 30 anos mutações químicas da cepa RH resultaram no isolamento cepa termo sensível TS-4

(Pfefferkorn, Pfefferkorn, 1976). A vacinação por essa cepa promoveu proteção significativa contra a formação de cistos teciduais e proteção parcial na toxoplasmose congênita (McLeod et al., 1988).

Com o advento da tecnologia da proteína recombinante, diversos antígenos de *T. gondii* produzidos por bactérias foram avaliados em vacinas. Vacinas baseadas nas proteínas recombinante SAG1 poderiam proteger contra toxoplasmose aguda (Petersen et al., 1998), porém a proteção completa contra a doença aguda ou toxoplasmose crônica em camundongos só foi obtida pelo uso de fortes adjuvantes como adjuvante completo Freund's e QuilA (Khan et al., 1991; Mishima et al., 2001).

Vacinas de DNA utilizando múltiplas combinações em uma única formulação podem ser significantes na indução de resposta imune celular e proteção quando comparadas a um único gene vacinal. Estudos com vacinas de DNA prolongaram a proteção contra a toxoplasmose aguda na infecção com a cepa RH em camundongos, mas o resultado só foi obtido pelo uso de uma combinação de SAG1 com ROP2 (Fachado et al., 2003). Em contrapartida, os usos de vacinas de DNA necessitam de uma análise profunda em relação ao vetor utilizado já que nenhum estudo foi realizado a fim de determinar qual seria o mais apropriado.

Como o cultivo de taquizoítos é de fácil obtenção, gerando extratos antigênicos em massa, o uso de antígenos solúveis obtidos a partir do extrato relacionadas aos poderes esterilizantes e de melhoramento de características antigênicas da radiação ionizante seriam capazes de induzir uma imunidade estéril além de aprimorar a apresentação antigênica a partir dos produtos oriundos dos efeitos da radiação ionizante, dando origem a uma potencial vacina para toxoplasmose.

3.2 Resposta Imune induzida por vacinas

Vacinas representam um grande triunfo da medicina moderno sendo um ponto importante na luta entre patógenos e humanos (Plotkin, 2008) Apesar do saneamento básico e antibiótico terem salvado vidas, vacinas ainda são as formas mais rentáveis com este intuito. As vacinas podem ser classificadas em dois grupos. O grupo compreendendo vacinas vivazes atenuadas, com versões enfraquecidas do patógeno (vacinas contra catapora, febre amarela, rubéola). Podem induzir forte

resposta celular e produção de anticorpos a partir de uma única imunização. O segundo grupo inclui vacinas de subunidades (vacina recombinante contra hepatite B), vacinas toxóides a partir de toxinas inativadas (vacinas contra difteria e tétano), vacinas a partir de carboidratos do patógeno (Vacina contra pneumococcus) e vacinas conjugadas, como as vacinas contra *Haemophilus influenzae* tipo B (Plotkin, 2008). Essas vacinas geralmente apresentam adjuvantes em sua fórmula para ampliarem a qualidade da resposta imune (Siegrist, 2012).

Funções imunológicas são de extrema importância para se observar as respostas específicas ao agente induzidas pela vacina. Essas funções são divididas em resposta humoral, respostas por células B de memória, respostas por células TCD4⁺ auxiliares ou células TCD8⁺. Na resposta humoral há a secreção de anticorpos (IgG, IgM e IgA secretora). Células TCD4⁺ auxiliam células B e células TCD8⁺ combatendo células infectadas (Siegrist, 2012). Na sua maioria, as vacinas induzem produção de anticorpos no soro ou na mucosa bloqueando a adesão dos agentes patogênicos as células epiteliais ou interferindo a invasão microbiana a corrente sanguínea (Pichirero, 2013). Para que ocorra proteção os anticorpos induzidos devem ser funcionais contra o agente e devem auxiliar o sistema imune a partir de opsoninas, ou se o agente exercer efeitos por alguma toxina os anticorpos devem ser capazes de neutralizá-la (Plotkin, 2008).

Para que ocorra a produção de células B de memória é necessário que aconteça um processo de seleção caracterizado por afinidade e maturação (Andersson et al., 1998). Após a vacinação os antígenos vão se tornando cada vez menos disponíveis, com isso, ocorrem mutações aleatórias nos genes de imunoglobulinas e as células B passam a expressar anticorpos de alta afinidade em sua superfície para o antígeno da vacina que está diminuindo persistirem como células B de memória (Siegrist, 2012) Vacinas induzem a produção de células de memória a partir da rápida produção de anticorpos como IgG; pelos altos níveis de anticorpos após a exposição primária ao antígeno; e pela produção de anticorpos de alta afinidade (avidez) contra o antígeno (Pichirero, 2013).

A medida da eficiência de uma imunização depende da medida da imunidade produzida. A produção isolada de anticorpos é uma medida factível e simples, mas nem sempre é proporcional a imunidade protetora desejada (Zorgi et al, 2011). A medida de anticorpos pode ser feita por técnicas simples como ELISA, aperfeiçoada pela mensuração da maturação da afinidade dos anticorpos, medida pela avidez dos

anticorpos (Schmidt et al., 2013). A qualidade de um anticorpo depende tanto de sua especificidade, mas também da afinidade com que o anticorpo reage com seu epítipo específico, o que é uma medida indireta da qualidade da imunização. Em geral, uma maturação de afinidade depende de sinapses mais complexas no centro germinativo que envolve cooperação celular maior do que a mera ativação de células B antígeno específica (Siegrist, 2012). A vacinação deve gerar respostas celulares de memória, tanto para o lado das células efectoras CD8⁺ como para o lado de células CD4⁺ auxiliaadoras e células B de memória. Em camundongos, estas células se concentram em vários órgãos linfoides, mas o maior deles é o baço, onde a resposta imune sistêmica pode ser analisada. A quantificação pode necessitar de quimeras proteicas antígeno-específicas, chamados tetrâmeros, limitados apenas para um epítipo e de difícil construção (Frickel et al, 2008.). Uma alternativa surgiu recentemente a partir da incorporação inócua de um marcador fluorescente às células imunes, seguidas de exposição ao antígeno, que pode ser até um extrato bruto. As células que respondem com proliferação vão dividir este composto fluorescente para as células filhas, permitindo sua identificação por citometria de fluxo, permitindo a fenotipagem de superfície destas células e assim identificar quais células responsivas ao antígeno proliferaram na cultura na presença de antígeno (Lyons, 2000). Esta abordagem permite definir se há uma estimulação ou bloqueio inespecífico pelo antígeno, afetando a proliferação inespecífica de células tanto dos imunizados como dos controles, o que ocorre em extratos destes agentes (Feng, Sher, 2010).

A proliferação específica após cultura na presença de antígenos mostra as populações celulares responsivas específicas a um extrato bruto, o que é mais pertinente do que a medida isolada de proliferação a um tetrâmero que pode ser dependente do repertório de receptores de células T (Frickel et al, 2008). A proliferação de linfócitos de memória envolve três tipos celulares, a saber, células T auxiliaadoras, células T efectoras e células B de memória. As células T auxiliaadoras proliferadas podem ser identificadas pelo seu fenótipo CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻ enquanto as células efectoras podem ser identificadas pelo seu fenótipo CD3⁺, CD4⁻, CD8^{+high}. (Siegrist, 2012) Os linfócitos B de memória proliferados são identificados pelo seu fenótipo CD19⁺, antes de seu comprometimento para plasmócitos. Esta abordagem simples pode ser mais efetiva na quantificação de células responsivas ao antígeno, ao invés das detecções em cultura com diluições e ELISPOTs para IFN (Cole, 2005).

3.2.1 Adjuvantes

Adjuvantes foram descritos pela primeira vez por Ramon (1924) como uma substância utilizada em combinação a um antígeno específico que produz uma resposta imune mais potente que o antígeno sozinho. Diversos compostos foram avaliados como adjuvantes incluindo sais minerais, produtos antimicrobianos, emulsões, saponinas, citocinas, polímeros, micropartículas e lipossomas (Guy, 2007). Para desencadear respostas imunes os adjuvantes apresentam alguns mecanismos de ação como: liberação gradual do antígeno no local da imunização, aumento na regulação de citocinas e quimiocinas desencadeando respostas de células T, recrutamento de células imunes até o sítio de imunização, aumento da absorção de antígenos e apresentação para células apresentadoras de antígeno (APCs) (Brito et al., 2013). Após o reconhecimento do antígeno as células ativadas irão migrar até órgãos linfóides locais onde irá ocorrer o desenvolvimento da resposta imune específica. (Fraser et al., 2007; Hoebe et al., 2004).

De acordo com a sua classificação adjuvantes podem ser: imuno-estimulantes ativos, caracterizados por aumentar a resposta imune ao antígeno; transportadores apresentando as proteínas imunogênicas com ajuda de células T; adjuvantes de veículo, como óleo emulsões ou lipossomas, servindo de matriz para estímulo da resposta imune pelo antígeno. Apesar dos progressos na identificação de mecanismos de ações adjuvantes o único adjuvante destinado a uso humano ainda é o alúmen (Clapp et al., 2011). Embora diversos adjuvantes venham sendo propostos ao longo dos anos estes ainda não foram bem sucedidos para seres humanos, devido a sua toxicidade, estabilidade e custos. Devido às mudanças de tamanho, carga elétrica e hidrofobicidade geradas a partir da incorporação de proteínas em formulações adjuvantes ainda é difícil prever qual adjuvante funcionará melhor junto a proteínas ou peptídeos específicos (Brito et al., 2013).

O sucesso do uso de um adjuvante está associado com sua segurança, tolerância, simplicidade, baixo custo, capacidade de processamento pelo hospedeiro e facilidade de associação com antígenos proteicos (Brito et al., 2013). Apenas alguns adjuvantes lipídicos foram aprovados para uso humano, tanto na forma de adição a alúmen ou na forma de lipossomas transportadores sintéticos (Brito et al., 2013), mas no momento, existem poucas exceções aprovadas pelos órgãos reguladores, o único adjuvante aceitável para uso humano é o alúmen, desde que

administrado em pequena dosagem para evitar a eventual toxicidade do alumínio adsorvido (Mitkus et al., 2011).

3.3 Radiação Ionizante

A radiação ionizante consiste em ondas eletromagnéticas que se propagam com alta velocidade, energia e ao interagir com a matéria pode produzir efeitos variados, como ionização e excitação. A radiação gama age por duas vias, na ação direta que decorre da transferência da energia para a molécula alvo, provocando ionização e modificação da estrutura química, gerando alteração na função biológica. E na ação indireta e mais frequentemente, a radiação age pela interação com a água do meio, molécula mais encontrada nos sistemas biológicos, formando hidrogênios moleculares (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e vários radicais livres, como hidroxila ($OH\bullet$), elétron aquoso ($e\text{-aq}$), átomos de hidrogênio ($H\bullet$) e peroxila ($HO_2\bullet$). Estes radicais interagem com moléculas biológicas, afetando estruturas celulares e ampliando os efeitos da radiação, devido ao seu potencial oxidante. (Michaels, Hunt, 1978).

Nas moléculas de água os átomos estão unidos através de ligações químicas formadas por um par de elétrons. Quando a radiação interage com as moléculas de água, estas ligações químicas se desfazem e, cada fragmento molecular passa a conter um único elétron em sua órbita externa, agora não pareado e ávido por estabelecer nova ligação. Estes fragmentos carregados, instáveis e reativos constituem os produtos da radiólise da água (Stefanic et al., 2009). Dentre os produtos da radiólise da água, destaca-se o radical hidroxila ($OH\bullet$), responsável pela abstração dos hidrogênios do carbono alfa e de grupamentos sulfidrilas, além de reagir com anéis aromáticos de aminoácidos como o triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radical altamente reativo. O elétron aquoso ($e\text{-aq}$), além de reagir com os hidrogênios dos aminoácidos aromáticos, pode promover a desaminação de aminoácidos como a alanina, glicina, histidina, cisteína e cistina (Butler et al., 1984). O $OH\bullet$ pode ser o principal responsável pela agregação das proteínas, devido a sua capacidade de formar ligações cruzadas entre elas (Hawkins, Davies, 2001).

As alterações químicas que a radiação causa em proteínas são: fragmentação, “cross-linking”, agregação e oxidação pelos produtos gerados na

radiólise da água (Moon, Song, 2000). A irradiação de proteínas, no estado seco ou em solução aquosa, pode induzir uma série de alterações na estrutura protéica, indo desde simples ionizações, até alterações drásticas na sua estrutura primária. Podem ocorrer alterações oxidativas decorrentes da interação dos radicais livres primários, produzidos após a radiólise da água, com a molécula de proteína, alterando sua estrutura e podendo conferir à mesma, cargas negativas (Wales, Kusel, 1992).

Apesar das vacinas produzidas a partir de parasitas irradiados terem se demonstrado eficazes e seu uso promissor, apresentam dificuldades de cultivo em larga escala e na logística da conservação das doses vacinais. Sendo assim, o uso de proteínas associadas aos efeitos da radiação ionizante em proteínas pode apresentar uma ferramenta importante no desenvolvimento alternativo de modelos vacinais. Os efeitos da radiação ionizante sobre proteínas melhoram o processamento por células imunes e radicais livres, levando a apresentação de antígenos diferencial pelo reconhecimento por *Scavenger receptors* (Cardi et al., 1998) e induzindo uma imunidade celular adaptativa mais intensa (Pinho et al., 1995). O uso de vacinas produzidas a partir do antígeno apresentando um maior espectro de proteínas antigênicas, nos leva a crer que com a radiação ionizante haveria uma melhor apresentação de antígenos na ausência de adjuvantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitas

Os parasitas de *T. gondii* utilizados nos experimentos são mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (USP-Universidade de São Paulo).

4.1.1 Cepas RH virulentas (tipo I)

Taquizoítos da cepa RH virulenta utilizados para o preparo do antígeno e no desafio dos animais imunizados foram mantidas por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss ou C57Bl/6J. Os animais previamente infectados são sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ e o peritônio lavado com solução salina ou solução tamponada com fosfato – NaCl 0,15 M/ tampão fosfato de sódio 0,01 M pH7,2 (PBS), contendo Penicilina cristalina 2500 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL. Após quantificação em câmara de Neubauer, os taquizoítos são inoculados (i.p) em novos animais.

4.1.2 Cepas ME-49 cistogênica (tipo II)

Cistos da cepa ME-49 utilizadas no desafio dos animais imunizados foram gentilmente cedidos ao laboratório pelo Prof. Dr. Fausto Araújo, (UCLA- University of California, Los Angeles). Esta cepa foi mantida através de sucessivas passagens, com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos C57Bl/6J. Cada animal foi inoculado por via oral (v.o), com uma suspensão de 10 cistos por animal, obtida após maceração de cérebro de camundongos previamente infectados, com 3,0 mL de PBS pH7,2 estéril. Para a quantificação dos cistos, 20 µL da suspensão cerebral foram colocadas entre lâmina e lamínula e observados ao microscópio de luz, sob objetiva de 40x, com determinação do número de cistos por cérebro analisado.

4.2 Animais experimentais

Para os experimentos de imunização e desafio serão utilizados camundongos machos BALB/c todos com peso entre 20 e 22g fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Todos foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada recebendo ração comercial Nuvital® (Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os animais utilizados serão eutanasiados em câmara de CO₂ e a manipulação conduzida de acordo com as normas de cuidados de animais de laboratório (Clark, 1996) e com os “Princípios de Ética em Experimentação Animal” – Sociedade Brasileira de Ciências Animais de laboratório (SBCAL).

4.3 Obtenção do antígeno de extrato total de *Toxoplasma gondii*

Os parasitas obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente inoculados foram inicialmente filtrados em membrana de policarbonato de 3,0 µm (Millipore®, Billerica, MA, USA) para remoção de outros tipos celulares presentes após o lavado. Os parasitas purificados foram submetidos a sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc, USA), a 40 ciclos por 5-10 períodos de 30 segundos, em banho de gelo, até a lise completa dos agentes. Em seguida acrescentou-se solução 0,3 M de NaCl para isotonzar a suspensão, e após submetido a centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno (Camargo et al., 1978).

4.4 Obtenção do antígeno solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (AgTg) por ação de detergente neutro

Os parasitas da cepa RH do tipo I virulenta utilizados foram obtidos através do exsudato peritoneal de camundongos *Swiss* previamente infectados. O exsudato apresenta taquizoítos e células livres do infiltrado inflamatório, para retirada dessas células é realizada uma retenção das mesmas em filtro de policarbonato com poros de 3 µm (Millipore®), e os taquizoítos recuperados por centrifugação do filtrado formando pellet. O pellet obtido foi suspenso em tampão contendo EDTA (ácido

etilenodiamino tetra-acético), benzamidina, PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil, Pierce[®], Rockford, IL USA) e DOC (Desoxicolato de sódio) a 05% para lise dos taquizoítos e da maior parte das organelas intracelulares com exceção dos núcleos, liberando proteínas solúveis e algumas proteínas de membrana. Para o clareamento do pellet, realizamos a centrifugação da suspensão a 10000rpm por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi submetido à cromatografia de exclusão molecular utilizando SEPHADEX[®] G-25 previamente hidratada por 2 volumes de PBS estéril e montada sobre coluna de cromatografia (BioRad[®] Laboratories, Califórnia, EUA) para retirada total de detergentes, peptídeos e produtos de degradação, restando apenas proteínas. Após hidratação e lavagem da coluna foram aplicados 2 volumes do exsudato, seguidos de lavagens com PBS estéril. Após o processo de cromatografia o antígeno foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore[®]), diluído em PBS estéril e dosado pelo método Bradford (1976) adaptado para microplaca para obtenção de alíquotas de 1,5 mL com concentração final de 200µg de proteína por mL e 670 µg totais em um experimento típico com 05 camundongos infectados. Todas as fases foram colhidas para análise em SDS-PAGE.

4.5 Irradiação do AgTg em fonte homogênea de Cobalto-60 (⁶⁰Co)

Alíquotas de 1,5 mL foram descongeladas, colocadas em banho de gelo e transportadas do laboratório para o IPEN/CNEN para a irradiação. Numa primeira fase, as alíquotas de AgTg foram submetidas a diferentes doses de radiação: a 500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy, com blindagem de 70% pela exposição a raios-γ de uma fonte de Cobalto-60 (Gammacel[®] Atomic Energy of Pinawa, Canadá) de forma homogênea, com presença de O₂ e uma taxa de dose de 1,34 kGy/hora. Alíquotas foram transportadas nas mesmas condições e mantidas fora da câmara em banho de gelo para mimetizar o processo (não foram observadas formações de precipitado visível ou obtido por centrifugação nesta fase). Após definição da dose de estudo as alíquotas de AgTg foram submetidas a doses de radiação a 1500Gy seguindo os mesmos procedimentos anteriormente descritos.

4.6 Caracterização das proteínas do AgTg nativas e irradiadas por ^{60}Co

4.6.1 SDS-PAGE

As alíquotas do processo de preparação do antígeno nativo e do antígeno irradiado foram submetidas a SDS-PAGE para separação das proteínas presentes no extrato, segundo o método Laemli (1970). Alíquotas de 20 μL das amostras nativas e irradiadas, foram homogeneizadas com tampão de amostra (60Mm Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto pH6,8; 2% de dodecil sulfato de sódio; 10% de glicerol; 0,01% de azul de bromofenol; 5% de β -mercaptoetanol) Em seguida foram aquecidas a 99 °C por 4 minutos e submetidas a eletroforese em gel de eletroforese na concentração de 12,5%. A eletroforese foi efetuada a 100mA, por aproximadamente 2h em tampão Tris glicina (3% de Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto, 1% de dodecil sulfato de sódio, 14% de glicina), juntamente com o padrão molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific®, EUA). Após a eletroforese os géis foram corados por *Comassie Blue R-250* (BioRad® Laboratories) sob agitação por aproximadamente 1 hora e descorado com tampão descorante (30% de metanol, 7% de ácido acético e água ultrapura q.s.p).

4.6.2 Quantificação de proteínas por densitometria digital

A quantificação relativa das proteínas após a irradiação por ^{60}Co foi realizada por densitometria das bandas através do programa IMAGEJ (National Institutes of Health, Mayland, EUA) que mede o número e a intensidade de pixels da área das bandas formadas a partir de fotos digitalizadas dos géis de SDS-PAGE. Cada pico do gráfico gerado é específico de uma proteína.

4.7 Imunização dos animais

A princípio a fim de se escolher qual a melhor dose a ser utilizada, camundongos BALB/c foram divididos em grupos de 04 animais e imunizados via subcutânea com 03 doses a cada 15 dias do extrato salino nativo ou irradiado a diferentes doses de 60-Cobalto: 500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy. Após a escolha da melhor dose, grupos de 05 camundongos BALB/c foram imunizados com 03 doses a cada 15 dias por via subcutânea com antígeno nativo e com antígeno irradiado a 1500Gy de Cobalto-60.

4.8 Obtenção das amostras de soro dos animais imunizados

As amostras de sangue dos animais foram obtidas, semanalmente, por secção leve da extremidade final da cauda dos camundongos BALB/c imunizados e coletados em papel filtro, estocadas e secas a -20 °C. Antes do uso, o soro foi extraído com 300 µL de tampão contendo Tris/HCl 10 mM pH 7.5, NH₄Cl 150 mM, NaN₃ para lise de eritrócitos e conversão da hemoglobina afim de estabilizar a ciano-hemoglobina (Frenchik et al., 2004). Após a eluição as amostras são lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540nm para ajuste das diluições.

4.9 Preparo de membranas transferidas com AgTg irradiados e nativo para ensaios de imunogenicidade (Western Blot)

As proteínas do AgTg foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore®) utilizando aparato de transferência em sistema úmido (BioRad® Laboratories), sob corrente elétrica constante de 10 volts, a 40 minutos em tampão de transferência (250 mM de Tris (Hidroximetil) aminometano hidrocloreto, pH8,3; 192 mM de glicina; 20% de metanol v/v), segundo Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Uma vez feita a transferência as membranas foram bloqueadas com solução 5% de leite desnatado Molico® em PBS 10mM, por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram submetidas a imunodeteção empregando soros de animais infectados pela cepa ME-49 de *T. gondii* nas diluições adequadas em solução 5% de leite desnatado

Molico[®] em PBS 10 mM. Após o período de incubação over night, sob agitação, as membranas foram lavadas por 03 vezes de 5 minutos cada com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBSTL). Uma vez lavadas, as membranas foram incubadas com IgG anti camundongo conjugada a peroxidase diluída a 1:5000 em solução de leite desnatado 5%, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Antes da revelação com solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (10 mg de DAB, 10 mL de PBS, 15 µL de peróxido de hidrogênio), o ciclo de lavagem das membranas foi repetido. A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

4.9.1 Preparo de membranas transferidas com antígeno de extrato total de *T. gondii* para os ensaios de antigenicidade (Western Blot)

As proteínas do extrato total de *T. gondii* foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore[®]) utilizando aparato de transferência em sistema úmido (BioRad[®] Laboratories), sob corrente elétrica constante de 10 volts, a 40 minutos em tampão de transferência (250 mM de Tris (Hidroximetil) aminometano hidrocloreto, pH8,3; 192 mM de glicina; 20% de metanol v/v), segundo Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Uma vez feita a transferência as membranas foram bloqueadas com solução 5% de leite desnatado Molico[®] em PBS 10mM (PBSTL), por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram submetidas a imunodeteção empregando soros dos animais imunizados pelo AgTg nativo ou irradiado a diferentes doses de Cobalto-60 nas diluições adequadas em solução 5% de leite desnatado Molico[®] em PBS 10 mM. Após o período de incubação “over night”, sob agitação, as membranas foram lavadas por 03 vezes de 5 minutos cada com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBST). Uma vez lavadas, as membranas foram incubadas com IgG anti camundongo conjugada a peroxidase diluída a 1:5000 em solução de leite desnatado 5%, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Antes da revelação com solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (10 mg de DAB, 10 mL de PBS, 15 µL de peróxido de hidrogênio), o ciclo de lavagem das membranas foi repetido. A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

4.10 Dot-blot

O ensaio de dot-blot foi realizado a partir da metodologia descrita por Stott (1989). A membrana de nitrocelulose (Millipore®), foi recortada no tamanho apropriado, 8x12cm, e disposta no aparelho de blot (BioRad® Laboratories) de 96 poços onde foram adicionados 100µL/poço (1µg/mL) do antígeno de extrato total de *T. gondii* suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,5, durante 1 hora. Após essa etapa a membrana foi lavada com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBST) e bloqueada durante 1 hora por PBSTL, após este período a membrana foi novamente lavada pela adição de PBST. Após o bloqueio e as lavagens as membranas foram submetidas à imunodeteção empregando soros de animais imunizados pelo AgTg irradiado a diferentes doses de Cobalto-60 em diferentes diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800) em solução 5% de leite desnatado Molico® em PBS 10 mM. Após o período de incubação de 1 hora, as membranas foram lavadas por 03 vezes com PBST. Uma vez lavadas, as membranas foram incubadas com IgG anti camundongo conjugada a peroxidase diluída a 1:5000 em solução de leite desnatado 5%, por 1 hora. Antes da revelação com solução contendo 3,3' - diaminobenzidina (DAB) (10mg de DAB, 10 mL de PBS, 15 µL de peróxido de hidrogênio), o ciclo de lavagem das membranas foi repetido. A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

4.11 Ensaio de imunogenicidade para detecção do reconhecimento de anticorpos específicos por AgTg irradiado a diferentes doses de ⁶⁰CO (ELISA)

Placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL/poço (1 µg/mL) de AgTg irradiado a diferentes doses de Cobalto-60, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1M pH9,5, over night a 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas por 5 vezes durante 5 minutos cada com PBS contendo 0,05% de Tween-20, 0,3% de leite desnatado (PBSTL) e bloqueadas com solução PBSTL durante 1 hora em estufa a 37 °C. Após o bloqueio foram depositados na placa 100 µL/poço de soro de animais infectados pela cepa ME-49 de *T. gondii* ajustado para uma diluição de 1/100 e incubados novamente a 37 °C por 1 hora. As placas foram lavadas

novamente 5 vezes durante 5 minutos cada com PBSTL e foram aplicados 100 µL/poço de conjugado anti IgG de camunongo na diluição 1:20000, marcado com peroxidase (Sigma[®], Sigma- Aldrich Co., St Louis , MO, USA), com incubação de 1 hora a 37 °C. Após novas lavagens (5 vezes durante 5 minutos), a revelação da reação foi realizada pela adição de 100 µL/poço de OPD (Ofenilodiamina 1mg/mL, peróxido de hidrogênio 0,03% em 20 mL de água MiliQ) por 30 minutos e interrompida pela adição de 50 µL/poço de HCL 4N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor de microplacas Multimode Microplate Reader FilterMax FS (Molecular Devices[®], Califórnia, EUA) nos filtros de absorbância de 495nm.

4.12 ELISA para detecção de anticorpos IgG séricos específicos anti *T. gondii* no soro de camundongos imunizados por AgTg nativo ou irradiado a diferentes doses de ⁶⁰CO

Placas de 384 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 40 µL/poço (1 µg/mL) de antígeno de extrato total de *T. gondii*, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1M ph 9,5, over night a 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas por 5 vezes durante 5 minutos cada com PBS contendo 0,05% de Tween-20, 0,3% de leite desnatado (PBSTL) e bloqueadas com solução PBSTL durante 1 hora em estufa a 37 °C. Após o bloqueio foram depositados na placa 40 µL/poço de soro ajustado para uma diluição de 1/100 e incubados novamente a 37 °C por 1 hora. As placas foram lavadas novamente 5 vezes durante 5 minutos cada com PBSTL e foram aplicados 40 µL/poço de conjugado anti IgG de camunongo na diluição 1:20000, marcado com peroxidase (Sigma[®], Sigma- Aldrich Co., St Louis , MO, USA), com incubação de 1 hora a 37°C. Após novas lavagens (5 vezes durante 5 minutos), a revelação da reação foi realizada pela adição de 40 µL/poço de OPD (Ofenilodiamina 1 mg/mL, peróxido de hidrogênio 0,03% em 20 mL de água MiliQ) por 30 minutos e interrompida pela adição de 20 µL/poço de HCL 4N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor de microplacas Multimode Microplate Reader FilterMax FS (Molecular Devices[®]) nos filtros de absorbância de 495nm.

4.13 Detecção da avidéz de anticorpos específicos IgG séricos anti *T. gondii* por ELISA

O ELISA de avidéz foi realizado da mesma forma como descrito acima exceto pela adição de 40 µL/poço em metade das amostras de uma solução caotrópica (Uréia 6M, enquanto o restante dos poços foram mantidos em PBSTL, com período de incubação de 15 minutos a 37 °C. A seguir após as lavagens (5 vezes durante 5 minutos), foram aplicados em cada poço 40 µL de conjugado anti IgG de camundongo (1:20000) marcado com peroxidase e as placas mantidas por 1 hora a 37 °C. Após as lavagens (5 vezes durante 5 minutos), a revelação foi feita pela adição de 40 µL/poço de OPD (Ofenilodiamina 1mg/mL, peróxido de hidrogênio 0,03% em 20 mL de água MiliQ) por 30 minutos e interrompida pela adição de 20 µL/poço de HCL 4N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor de microplacas Multimode Microplate Reader FilterMax FS (Molecular Devices®) nos filtros de absorbância de 495nm.

4.14 Quantificação de cistos cerebrais da cepa ME-49 por Real time PCR

4.14.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando kit comercial QIAamp® DNA mini kit(Qiagen®, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Em cada tubo foram adicionados 20µL de proteinase K, junto a 180 µL de tampão ATL. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em “banho Maria” a 56°C, durante 03 horas, e agitadas a cada hora. Após este período adicionaram-se a cada tubo 200 µL de tampão AL, sendo os mesmo aquecidos a 70°C durante 10 minutos para a inativação da proteinase K residual. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol. A solução resultante foi transferida para as colunas QIAamp DNA mini-kit e centrifugadas a 800 rpm por 01 minuto. Após a centrifugação foram adicionados a coluna 500 µL de tampão AW1 (Wash Buffer 1) e centrifugadas novamente a 800 rpm por 01 minuto. O procedimento de lavagem foi repetido pela adição de 500 µL de tampão AW2 (Wash Buffer 2), seguido de centrifugação a 14000 rpm durante 03

minutos. O DNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 200 µL de água MiliQ e armazenado a -20° C.

4.14.2 Confeção dos Primers

Os primers 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 do primer utilizado para realização do Real-Time PCR

Primer	Sequência	Produto (pb)
B1JW63	GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG	24
B1JW62	TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC	

4.14.3 Condições da reação e análise dos resultados

Os ensaios de real time PCR foram realizados no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems[®], EUA), utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) seguindo protocolo 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 um minuto e seguido de um passo de denaturação. Os resultados foram expressos em valores Ct (*cycle threshold* – nº de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção). Todas as amostras foram testadas em triplicatas.

4.15 Desafio de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg nativo ou irradiado por cepa RH virulenta (tipo I)

Parasitas obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente inoculados e filtrados em membrana de policarbonato de 3,0 µm (Millipore[®]) para remoção de outros tipos celulares presentes, foram ressuspensos em solução salina e quantificados em câmara de Neubauer para ajuste da concentração de células para 10³ células/mL. Os animais imunizados foram desafiados com 100 µL de salina

contendo 10^3 taquizoítos de *T. gondii* viáveis por via intraperitoneal. Um grupo controle de camundongos BALB/c não imunizados foram inoculados com a mesma quantidade de taquizoítos. A mortalidade foi acompanhada diariamente.

4.16 Desafio dos camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg nativo ou irradiado utilizando cepa ME-49 (tipo II)

Para obtenção de cistos de *T.gondii*, foram utilizados camundongos C57Bl/6J cronicamente infectados com a cepa ME-49. Os cérebros dos animais foram retirados e homogeneizados em seringas de 5mL contendo 3mL de solução salina, a quantidade de cistos foi verificada por microscopia óptica convencional. Os camundongos imunizados foram desafiados 15 dias após a última dose com 10 cistos via oral. Um grupo controle de camundongos BALB/c não imunizados foram inoculados com a mesma quantidade de cistos. Após um período de 30 dias, os camundongos foram sacrificados e o cérebro macerado em solução salina e observado em microscopia óptica para determinação do número de cistos. A mortalidade foi acompanhada diariamente. Alíquotas de 2 mL dos macerados foram utilizadas para extração de DNA.

4.17 Citometria de Fluxo – Ensaio de CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)

4.17.1 Cultura celular de células esplênicas

As células esplênicas foram obtidas de camundongos BALB/c imunizados pelo antígeno nativo, imunizados pelo antígeno irradiado a 1500 Gy, camundongos infectados pela cepa cistogênica ME-49 e camundongos normais. As células esplênicas foram retiradas de maneira estéril em fluxo laminar e dissociadas em filtro de células (cell strainer BD Biosciences®, New Jersey, EUA) na presença 7mL de meio RPMI 1640 (Gibco®, EUA) suplementado com 100U/mL de Penicilina, bicarbonato de sódio e HEPES 25mM. Para remoção das hemácias foram acrescentados 7mL de solução de lise v/v (0,16M de cloreto de amônio e 0,17M de Tris (hidroximetil) aminometano pH7,2) seguido da centrifugação a 2800 rpm por 15 minutos a 4°C para obtenção de pellet. Após a centrifugação o sobrenadante foi

desprezado e as células ressuspensas em 1mL de meio de cultura. As células esplênicas foram contadas em câmara de Neubauer.

4.17.2 Marcação com CFSE

Após o ajuste da concentração das células para 4×10^6 células/mL foram acrescentados uma diluição apropriada CFSE diluído em salina para uma concentração final de 5 μ M (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) e deixados sob incubação por 10 minutos na estufa com 5% de CO₂ a 37 °C, após esse período as células foram agitadas para a marcação homogênea das células e mantidas novamente na estufa por 5 minutos. Após este período centrifugamos as amostras a 2000rpm por 8 minutos a 4°C, o sobrenadante foi dispensado e o pellet ressuspendido em 1mL de meio RPMI 1640 contendo soro fetal bovino 10%, após a homogeneização do pellet foram acrescentados mais 9mL do meio, (este processo foi repetido por duas vezes para retirar o excesso de CFSE das células). O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido em 3 mL de meio RPMI 1640 contendo soro fetal bovino a 10%. As células então foram distribuídas em placas de cultura (TPP®) e estimuladas na presença de antígeno de *T. gondii* (30 μ g/mL), ConA (10 μ g/mL) (Concavalina A/estímulo inespecífico) e sem estímulo. As culturas foram mantidas em estufa a 5%de CO₂ a 37 °C por 144 horas (6 dias).

4.17.3 Marcação intracelular

Após o período de incubação as células foram coletadas da cultura, transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas a 2000 rpm por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido ressuspendido em 200µL de tampão *isoton*[®] onde 50 µL foram transferidos para tubos de citometria para marcação da superfície celular com anticorpos monoclonais diluídos na concentração 1:50 em PBS contendo BSA1%. Para a análise de linfócitos *T helper* foram utilizados anticorpos monoclonais CD3 (Pacific Blue) e CD4 (Horizon V500), para linfócitos T citotóxicos utilizamos anticorpos monoclonais CD3 (Pacific Blue) e CD8 (APC-H7) e para linfócitos B utilizamos anticorpos monoclonais CD19 (PE-Cy-7). As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C na ausência de luz. Após esse período as células foram submetidas à análise no citômetro de fluxo (LSRFortessa, BD Biosciences[®]). Os dados foram coletados em FACSDIVA BD software e analisados em Flowjo X software.

4.17.4 Estratégia de Análise

Para analisar a proliferação celular esplênica de células *T helper*, células T citotóxicas e linfócitos B com a marcação de CFSE dos camundongos BALB/c imunizados com antígeno irradiado e antígeno nativo, camundongos infectados pela cepa ME-49 e controles foi utilizada a estratégia de análise esquematizada abaixo.

Figura 2 – Estratégia de análise da proliferação celular esplênica de células T *helper*, células T citotóxicas e linfócitos B com a marcação de CFSE dos camundongos BALB/c imunizados com antígeno irradiado e antígeno nativo.

4.18 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Dados quantitativos de comparação entre os grupos de animais imunizados foram analisados por ANOVA (Análise de variância), utilizando pós-teste Bonferroni e para identificar a diferença entre os grupos utilizamos como nível de significância a probabilidade de igualdade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Produção de taquizoítos purificados da cepa RH de *Toxoplasma gondii*

Para a produção de taquizoítos de *T. gondii* utilizamos parasitas do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados. Na Figura 3A podemos observar a presença de macrófagos peritoneais e outros tipos de células livres presentes no infiltrado inflamatório. A seguir, o exsudato foi filtrado para retirada de células livres para obtenção de taquizoítos livres de células e outros artefatos como podemos observar na Figura 3B. Após a purificação apesar da redução de parasitas, encontramos menor número de células e outros artefatos que possivelmente comprometeriam o antígeno.

Figura 3 - Microscopia de exsudato peritoneal de camundongos Swiss infectados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, após 5 dias de infecção. **A** - Exsudato peritoneal bruto antes da filtração, presença de taquizoítos, e células intraperitoneais; **B** - Taquizoítos filtrados a partir do exsudato peritoneal livre de células intraperitoneais e outros artefatos. Preparo por citocentrifuga e corado por Leishman. Aumento original 100x.

5.1.1 Purificação de antígeno solúvel de taquizoítos de *T. gondii* (AgTg) por ação de detergente neutro

Para obtenção do antígeno salino solúvel, o sedimento de taquizoítos foi lisado por tampão contendo detergentes como descrito em Métodos. Após a cromatografia para exclusão de detergentes, peptídeos e outros produtos de degradação de menor peso molecular o antígeno purificado foi submetido a quantificação de proteínas. Na figura 4, observamos a quantificação de proteínas totais, utilizando reagente de Bradford. A recuperação do antígeno foi realizada nos pontos 5 e 6 (quadro vermelho), onde podemos observar maior concentração de proteínas.

Figura 4 - Quantificação de proteínas de taquizoítos de *T. gondii* obtidas após purificação utilizando SEPHADEX® G-25 por método Bradford. Antígeno recuperado nos pontos 5 e 6 marcados pelo quadrado em vermelho.

Após a purificação as alíquotas numeradas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE. As frações proteicas podem ser observadas nas alíquotas 5 e 6, sendo que peptídeos de menor peso molecular podem ser observados nas frações 7 e 8, acompanhando a migração eletroforética (Figura 5A). O antígeno purificado apresentou uma grande variedade de bandas entre 15kDa e 95kDa. O gel de poliacrilamida foi submetido a densitometria digital, para análise da

intensidade de cor apresentadas pelas bandas presentes no gel, como podemos observar na Figura 5B. Os gráficos 5 e 6, apresentaram os picos de proteínas presentes no antígeno de *T. gondii* após a purificação.

Figura 5 – (A) Perfil eletroforético de antígeno solúvel de taquizoítos de *T. gondii* purificado em SEPHADEX® G-25. **1** - Antígeno solúvel de *T. gondii* não purificado; **5** - antígeno solúvel de *T. gondii* purificado; **6** - antígeno solúvel de *T. gondii* purificado; **7** - Frações de menor peso molecular; **8** - Frações de menor peso molecular. **(B)** Gráficos de densitometria digital demonstrando intensidade das bandas analisadas: **Gráfico 1** - AgTg solúvel não purificado; **Gráfico 2** - Fração 4; **Gráfico 3** - AgTg solúvel purificado; **Gráfico 4** - AgTg solúvel purificado; **Gráfico 5** - Fração com < peso molecular; **Gráfico 6** - Fração com < peso molecular.

5.2 Irradiação e análise eletroforética de amostras de AgTg irradiadas a diferentes doses de Cobalto-60: 500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy

Uma mesma fração antigênica do AgTg foi submetida a irradiação uniforme por Cobalto 60 com diferentes doses. Para cada alíquota irradiada preparamos uma amostra controle que foi mantida em temperatura ambiente ao lado externo da câmara (Amostra não irradiada). Cada amostra de antígeno de *T. gondii* irradiado foi analisada por SDS-PAGE, conforme descritos em Métodos. Os achados nos antígeno irradiados a 500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy foram analisados pela

inspeção visual do perfil eletroforético como observamos na Figura 6A e por densitometria digital na Figura 6B. O perfil eletroforético demonstra que as características dos antígenos irradiados a 500Gy (3), 1000Gy (5) e 2000Gy (7) são semelhantes aos achados nas amostras de antígeno nativo (2,4,6,8) não apresentando qualquer alteração das bandas características ou mesmo a formação de agregados de alto peso molecular. Já o antígeno irradiado a 4000Gy (9) apresentou-se como um arraste demonstrando possível degradação das proteínas do antígeno. A densitometria digital (Figura 6B) das amostras gera um gráfico da área corrida das amostras onde cada pico trata-se de uma proteína. O antígeno irradiado a 500Gy (Gráfico 3) apresentou-se semelhante ao antígeno nativo (Gráfico 2) sem grandes intervalos entre os picos, já os antígenos irradiados a 1000Gy (Gráfico 4), 2000Gy (Gráfico 5) e 4000Gy (Gráfico 6) apresentaram maiores intervalos entre os picos, mostrando que houve ação da radiação ionizante sob as proteínas do antígeno.

Figura 6 – (A) Perfil eletroforético das amostras de antígeno solúvel de *T. gondii* irradiadas a diferentes doses de Cobalto-60. **1-** Padrão Molecular; **2,4,6 e 8** – AgTg Nativo; **3** – AgTg a 500Gy; **5** – AgTg a 1000Gy; **7-** AgTg a 2000Gy; **9** – AgTg a 4000Gy. **(B)** Gráficos de densitometria digital demonstrando os níveis de intensidade das bandas analisadas. **Gráfico 1 - Padrão Molecular;** **Gráfico 2** – AgTg Nativo; **Gráfico 3** – AgTg irradiado a 500Gy; **Gráfico 5** – AgTg irradiado a 1000Gy; **Gráfico 7** – AgTg irradiado a 2000Gy; **Gráfico 9** – AgTg irradiado a 4000Gy.

5.3 Avaliação da imunogenicidade de AgTg nativo ou irradiado por diferentes doses de Cobalto-60 (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) por ELISA e Western Blot

A manutenção da imunogenicidade dos antígenos irradiados por diferentes doses foi avaliada primeiramente por ELISA utilizando o AgTg irradiado a diferentes doses de Cobalto-60. Na Figura 5 podemos observar que mesmo após a irradiação a diferentes doses os antígenos foram capazes de serem reconhecidos por anticorpos específicos anti *T. gondii* presentes no soro de camundongos infectados pela cepa ME-49 de *T. gondii*. Quando comparamos o extrato total de *T. gondii* e os AgTg nativo e irradiados a diferentes doses, notamos diferença significativa no reconhecimento dos anticorpos específicos pelos antígenos ($p < 0,0001$). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o AgTg nativo e os AgTg irradiados a diferentes doses. Entre as diferentes doses aplicadas ao AgTg podemos observar que com o aumento da dose há uma diminuição gradual do reconhecimento dos anticorpos pelo antígeno ($p < 0,05$), provavelmente porque a doses mais elevada ocorre maior degradação dos epítomos antigênicos (Figura 7).

Figura 7 - Imunogenicidade do AgTg irradiado a diferentes doses de ^{60}Co e AgTg nativo por ELISA (** = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$).

5.4 Western Blot utilizando AgTg irradiado a diferentes doses de Cobalto-60

A fim de avaliar a preservação dos epítomos imunogênicos do AgTg irradiados a diferentes doses, procedemos a SDS-PAGE, seguida da transferência em membranas de nitrocelulose para realização do Western Blot. Na Figura 8 podemos observar que houve o reconhecimento de anticorpos específicos anti-*T.gondii*, presentes em soro de animais infectados pela cepa ME-49 de *T. gondii*, independente da dose submetida ao AgTg. Não observamos diferença significativa no reconhecimento entre o AgTg nativo e o AgTg irradiado a 500Gy. Os AgTg irradiados a 1000Gy e 2000Gy reconheceram todos os epítomos com diferenças apenas na intensidade. Apenas o AgTg irradiado a 4000Gy não apresentou reatividade aos anticorpos sendo possível notar somente uma banda de aproximadamente 25kDa. Esses resultados foram similares aos encontrados no ensaio de ELISA, onde com o aumento da dose há perda gradual do reconhecimento dos anticorpos pelos epítomos imunogênicos.

Figura 8 – Avaliação da imunogenicidade de AgTg irradiado a diferentes doses de ^{60}Co e AgTg nativo, reagentes a soro positivo de cepa ME-49 (Diluição 1/100) por Western Blot. **1** – AgTg Nativo; **2** – AgTg irradiado a 500Gy; **3** – AgTg irradiado a 1000Gy; **4** – AgTg irradiado a 2000Gy; **5** – AgTg irradiado a 4000Gy; **PM** = Padrão Molecular.

5.5 Avaliação da antigenicidade de AgTg nativo ou irradiado por diferentes doses de 60-Cobalto (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) por Dot -blot

Para avaliar a antigenicidade do AgTg irradiado a diferentes doses foi realizado o ensaio *in vivo*, onde cada grupo de camundongos BALB/c foram imunizados com 03 doses de 100µg de AgTg irradiado por via subcutânea. Após 15 dias da última dose o sangue dos animais foram coletados a partir da leve secção da cauda, para realização do ensaio de dot-ELISA. Na Figura 7, observamos o reconhecimento dos anticorpos séricos específicos em diferentes diluições. Os animais imunizados pelo AgTg nativo apresentaram anticorpos séricos específicos em todas as diluições. Os animais imunizados com AgTg irradiado a 500Gy,

1000Gy e 2000Gy não apresentaram diferença significativa na produção de anticorpos específicos quando comparados ao AgTg nativo. Em maiores diluições do soro dos animais imunizados com AgTg irradiado a 4000Gy não houve reatividade dos anticorpos específicos (Figura 8).

Figura 9 – Avaliação da antigenicidade do soro de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a diferentes doses de ^{60}Co ou AgTg nativo por Dot-blot. 1- Diluições do soro: 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800; 2 – Soro BALB/c Normal; 3 – AgTg Nativo; 4 - AgTg irradiado a 500Gy; 5 – AgTg irradiado a 1000Gy; 6 – AgTg irradiado a 2000Gy; 7 – AgTg irradiado a 4000Gy; 8 – Controle Positivo: Soro animais infectado pela cepa ME-49.

5.6 Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado por diferentes doses de Cobalto-60 (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) ou antígeno nativo

Para avaliar a resposta imune humoral induzida pelo AgTg irradiado, os camundongos BALB/c foram imunizados (03 doses) por via subcutânea com o AgTg irradiado a diferentes doses. Para a realização do ensaio de ELISA as amostras de soro foram coletadas quinzenalmente por secção leve da parte final da cauda dos camundongos durante todo período de imunização. Na Figura 10, podemos observar o perfil da resposta imune humoral dos camundongos BALB/c imunizados com AgTg irradiado a diferentes doses. Camundongos que receberam o antígeno

irradiado a 500Gy (Figura 10A) ou a uma dose superior de 4000Gy (Figura 10D) não apresentaram níveis significativos de anticorpos IgG específicos no soro. Já os animais que receberam o antígeno irradiado com doses intermediárias, 1000 Gy e 2000 Gy apresentaram um aumento significativo de anticorpos específicos no soro desde a primeira dose, como é possível observar nas figuras 10B e 10C.

Figura 10 - Evolução da produção de anticorpos IgG anti *T. gondii*, detectadas em uma única diluição (1/100), em grupos de 04 camundongos BALB/c imunizados com antígeno de *T. gondii* submetido a diferentes doses de radiação de Cobalto-60. **(A)** Amostra irradiada a 500Gy, **(B)** Amostra irradiada a 1000Gy, **(C)** Amostra irradiada a 2000 Gy, **(D)** Amostra irradiadas a 4000Gy. (Barras representam a media e o erro padrão da média de cada grupo).

Podemos observar também que o antígeno irradiado a 1000Gy e 2000Gy apresentaram evolução na produção dos anticorpos IgG durante as imunizações (Figura 11). Camundongos imunizados pelo AgTg irradiado a 1000Gy (Figura 11A) e 2000Gy (Figura 11B) apresentaram um aumento crescente de anticorpos IgG específicos durante as 1^a, 2^a e 3^a imunizações.

Figura 11 – Curva linear da evolução da produção de anticorpos IgG anti *T.gondii*, detectadas em uma única diluição (1/100), em grupos de 04 camundongos BALB/c imunizados com antígeno de *T.gondii* submetido a 1000Gy (A) e 2000Gy (B) (Barras representam a média e o erro padrão da média de cada grupo).

5.7 Determinação e avides de IgG induzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com antígeno de *T. gondii* irradiados por diferentes doses de Cobalto-60 (500 Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy)

A determinação da avides de IgG foi determinada através de um ensaio imunoenzimático, onde anticorpos que apresentaram alta afinidade ao antígeno foram resistentes a uma solução caotrópica. Camundongos BALB/c imunizados pelo AgTg irradiado a diferentes doses, principalmente os animais que receberam o AgTg irradiado a 1000Gy e 2000Gy apresentaram níveis significativos ($p < 0.01$ e $p < 0.05$) de anticorpos específico de alta afinidade ao antígeno de extrato total de *T. gondii*, quando comparados ao AgTg nativo e a doses maiores ou menores como podemos observar na Figura 12.

Figura 12 - Determinação e avidéz de IgG induzidos por antígeno de *T.gondii* submetido a diferentes doses de irradiação de ^{60}Co , 15 dias após a 3ª dose quinzenal. (*= $p<0.05$ e **= $p<0.01$ / Significativamente maior que controles e outros grupos por ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

5.8 Identificações da reatividade específica de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com antígeno de *T. gondii* irradiados a diferentes doses de Cobalto-60 (500Gy, 1000Gy, 2000Gy e 4000Gy) por Western Blot

Diferentes grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com 03 doses por via subcutânea com AgTg irradiado a diferentes doses. Após 15 dias da terceira dose foram coletados os soros por leve secção das caudas dos animais. Para avaliar a especificidade de anticorpos produzidos pelo AgTg irradiado a diferentes doses, procedemos a SDS-PAGE, seguida da transferência em membranas de nitrocelulose para realização do Western Blot (Figura 13). Os anticorpos específicos produzidos pelos animais imunizados pelo AgTg irradiados a 500Gy, 1000Gy e 2000Gy apresentaram reconhecimento de diversas bandas presentes no extrato

total de *T. gondii* quando comparadas ao controle positivo ME-49 incluindo a banda correspondente a proteína SAG-1, demonstrando que houve manutenção da antigenicidade mesmo após a radiação. Já o antígeno irradiado a 4000Gy foi capaz de reconhecer somente uma banda de aproximadamente 15 kDa o que nos sugere que a essa dose as proteínas do AgTg são quase que totalmente degradadas.

Figura 13 – Western Blot utilizando soro de camundongos BALB/c imunizados pelo AgTg irradiado a diferentes doses de Cobalto-60 **1** – Padrão Molecular (PM); **2** – Controle Positivo ME-49; **3** – Controle Negativo; **4** – AgTg Nativo; **5** – AgTg a 500Gy; **6** – AgTg a 1000Gy; **7** – AgTg a 2000Gy; **8** – AgTg a 4000Gy

5.9 Irradiação e análise eletroforética das amostras AgTg irradiado a 1500 Gy de Cobalto-60

Com base nos resultados obtidos com os ensaios anteriores observamos uma melhor produção de anticorpos anti-*T. gondii* específicos e maturados no antígeno irradiado a 1000Gy e 2000Gy de Cobalto-60. A partir destes resultados optamos por

irradiar o antígeno a 1500Gy que seria uma dose intermediária entre as duas melhores na produção de anticorpos anti-*T. gondii* e manutenção da imunogenicidade. Frações do antígeno purificado como descrito anteriormente foram submetidas à irradiação uniforme por Cobalto-60 a uma dose de 1500Gy. Após ser irradiada a amostra foi analisada por SAD-PAGE e densitometria digital (Figura 14). Na Figura 14A, podemos observar o perfil eletroforético do AgTg nativo (1) e do AgTg irradiado a 1500Gy (2). O AgTg irradiado a 1500Gy não apresentou mudanças significativas relacionadas a alteração de bandas características ou formação de agregados de alto peso molecular quando comparado ao AgTg nativo. Pela análise por densitometria (Figura 14B) notamos um maior número de picos no AgTg nativo (Gráfico 2) em relação a amostra AgTg irradiada a 1500Gy (Gráfico 3), mostrando que houve ação da radiação sobre as proteínas.

Figura 14 – (A) Perfil eletroforético das amostras de AgTg nativo e AgTg irradiado a 1500Gy de ^{60}Co . 1- Padrão Molecular; 2- Antígeno Nativo; 3- Antígeno irradiado a 1500Gy. **(B)** Gráficos de densitometria digital demonstrando os níveis de intensidade das bandas analisadas. **Gráfico 1 - Padrão Molecular; Gráfico 2 – AgTg Nativo; Gráfico 3 – AgTg irradiado a 1500Gy.**

5.10 Reatividade específica de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy de Cobalto-60 por Western Blot

Para avaliar a reatividade específica dos anticorpos produzidos pelo AgTg irradiado a 1500Gy, procedemos a SDS-PAGE utilizando antígeno do extrato total de *T. gondii*, seguida da transferência e reação com soros de animais imunizados quinzenalmente via subcutânea (03 doses) de AgTg nativo ou irradiado a 1500Gy de Cobalto-60 por *Western blot*. O AgTg irradiado a 1500Gy e o AgTg nativo foram capazes de reconhecer a maioria dos epítomos presentes no extrato total, porém anticorpos induzidos pelo AgTg nativo apresentaram uma menor intensidade de reconhecimento (Figura 15).

Figura 15 – Western Blot utilizando soro de camundongos BALB/c imunizados pelo antígeno de *T. gondii* irradiado a 1500Gy de ^{60}Co . 1 - **Padrão** Molecular (PM); 2 – Controle Positivo ME-49; 3 – Controle Negativo; 4 – AgTg Nativo; 5 – AgTg irradiado a 1500Gy.

5.11 Análise da antigenicidade do extrato de *T. gondii* irradiado a 1500Gy de Cobalto-60 por *Dot blot*

Avaliamos a antigenicidade do extrato do AgTg irradiado a 1500Gy de Cobalto-60 realizando ensaio de Dot-blot. Membranas de nitrocelulose sensibilizadas pelo antígeno de extrato total foram submetidas a imunodeteção utilizando soro em diferentes diluições, de camundongos BALB/c imunizados pela AgTg nativo ou

irradiado. O antígeno nativo conseguiu reconhecer fortemente o antígeno até a diluição 1/200, diminuindo o reconhecimento a partir da diluição 1/400. Quando observamos os pontos dos animais imunizados pelo antígeno irradiado a 1500Gy é possível notar forte reconhecimento nas diluições 1/100 e 1/200 e diminuição do reconhecimento a partir da diluição 1/400 mostrando a manutenção da antigenicidade após a irradiação, sem diferença significativa no reconhecimento dos antígenos por soro de camundongos imunizados pelo AgTg irradiado (Figura 16).

Figura 16 – Avaliação da antigenicidade do soro de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado 1500Gy de ^{60}Co ou AgTg nativo por Dot-blot. 1- Diluições do soro: 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800; 2 – Soro BALB/c Normal; 3 – AgTg Nativo; 4 - AgTg irradiado a 500Gy; 5 - Controle Positivo: Soro animais infectado pela cepa ME-49.

5.12 Resposta imune humoral sérica em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy de Cobalto-60

Para avaliar a resposta imune humoral produzida pelo AgTg irradiado a 1500Gy de ^{60}Co , soro de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea pelo

AgTg irradiado foi coletado 15 dias após a 3ª dose de imunização a partir da leve secção da cauda dos animais. Camundongos BALB/c imunizados pelo AgTg irradiado a 1500Gy tiveram aumento significativo ($p<0,05$) na produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* específicos em relação ao grupo imunizado pelo AgTg nativo (Figura 17).

Figura 17 - Resposta imune humoral sérica de camundongos BALB/c imunizados via subcutânea (3doses) pelo AgTG irradiado a 1500Gy de ^{60}Co ou antígeno nativo. Círculos preenchidos: Grupo controle (não imunizado); Círculos vazios: Grupo imunizado pelo antígeno nativo; Círculos com ponto central: Grupo imunizado pelo antígeno irradiado a 1500Gy. (* = $p<0.05$).

5.13 Determinação da avidéz de IgG induzidos em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy de Cobalto-60

Após avaliarmos a produção de anticorpos IgG específicos anti-IgG de *T. gondii*, analisamos a produção de anticorpos séricos de alta avidéz em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com 03 doses do AgTg irradiado a 1500Gy. Na figura 18, podemos observar aumento significativo na produção de anticorpos IgG específicos totais tanto nos animais imunizados pelo antígeno nativo (pontos vazios) quanto nos animais imunizados pelo antígeno irradiado a 1500Gy (pontos centrais). Quando analisamos a quantidade de anticorpos de alta avidéz por animal de cada grupo individualmente é possível observar aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de anticorpos de alta avidéz no grupo imunizado pelo AgTg a 1500Gy de ^{60}Co em relação ao grupo imunizado pelo antígeno nativo.

Figura 18 - Maturação da resposta imune humoral em animais imunizados com antígeno total de *T.gondii* nativo ou irradiado a 1500Gy, 15 dias após 03 imunizações, mostrando maior produção de anticorpos IgG por extrato irradiado. Pontos abertos representam grupo imunizado pelo antígeno nativo e símbolos com ponto central representam grupos imunizados pelo antígeno irradiado. Dados foram comparados com teste de t unicaudal (*= $p < 0.05$).

5.14 Proteção dos camundongos imunizados por via subcutânea com antígeno de *T. gondii* irradiado a 1500Gy por Cobalto-60, após desafio com cistos da cepa ME-49

5.14.1 Contagem de cistos cerebrais

Para avaliar a proteção de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy, foram desafiados com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral 15 dias após a 3ª dose. Após 30 dias do desafio, os animais sobreviventes foram sacrificados para quantificação de cistos cerebrais. O resultado pode ser visto na Figura 19. No grupo controle (infecção) houve 01 morte de animal após 15 dias do desafio. A análise do macerado cerebral, por microscopia

óptica demonstrou quantidade significativa de cistos teciduais. Os grupos imunizados, não apresentaram nenhuma morte. Os animais imunizados pelo AgTg nativo não apresentaram proteção significativa quando comparados ao grupo controle, enquanto os animais imunizados pelo AgTg irradiado a 1500Gy apresentam proteção significativa em relação aos grupos controle e os imunizados pelo AgTg nativo.

Figura 19 – Número de cistos cerebrais identificados por microscopia após 30 dias do desafio oral com 10 cistos de ME-49 em camundongos imunizados pelo AgTg nativo ou AgTg irradiado a 1500Gy de Cobalto-60. (*= $p < 0,05$); N.S=Não significativo.

5.14.2 Real time PCR

Para realizarmos a detecção de DNA de *T. gondii* em cérebros de camundongos BALB/c imunizados, com 03 doses do AgTg nativo ou pelo AgTG irradiado a 1500Gy de ^{60}Co por via subcutânea, e desafiados por cepa cistogênica ME-49 15 dias após a 3ª imunização, foi realizado o real-time PCR. Todos os valores foram obtidos em curvas de determinação da qualidade de cópias (CT). Foi possível notar diferença significativa entre os três grupos analisados ($p < 0.05$). Quando analisamos os grupos controle e AgTg Nativo não observamos diferença

significativa, mas entre os grupos imunizados pelo AgTg Nativo e AgTg irradiado a 1500Gy notamos diferença estatística ($p<0.05$), mostrando que o grupo imunizado pelo AgTg irradiado a 1500Gy apresentou menor detecção de quantidade de DNA de *T. gondii*.

Figura 20 – Quantificação por Real-Time PCR de DNA de *T. gondii* em cérebros de camundongos BALB/c imunizados pelo AgTg irradiado a 1500Gy ou AgTg nativo e desafiados por 10 cistos da cepa ME-49. (*= $p<0.05$).

5.15 Proteção de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg irradiado a 1500Gy por Cobalto-60, após desafio com cepa RH de *Toxoplasma gondii*

Os camundongos previamente imunizados com 03 doses por via subcutânea pelo AgTg irradiado a 1500Gy, foram desafiados 15 dias após a 3ª dose por 10^3 taquizoítos da cepa virulenta RH viáveis. O tempo de sobrevivência dos animais foi acompanhado diariamente e pode ser observado na Figura 21. Ambos os grupos imunizados apresentaram aumento de sobrevivência, sendo maior nos animais imunizados pelo AgTg irradiado a 1500Gy. Após 07 dias, todos os animais controle

(não imunizados) e 03 animais do grupo imunizado pelo AgTg nativo morreram. Já o grupo imunizado pelo AgTg irradiado a 1500Gy apresentou somente 1 animal morto 10 dias após o desafio.

Figura 21 – Sobrevivência de camundongos inoculados BALB/c previamente imunizados e desafiados por 10^3 taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH tipo I. (Teste Mantel-Cox: Qui-quadrado = 7.748; Grau de liberdade 2; $p = 0.0208$ /Tendência: Qui-quadrado = 6.299; Grau de liberdade 1; $p = 0.0121$).

5.16 Proliferação celular de linfócitos *T helper* ($CD3^+CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) de camundongos BALB/c imunizados com AgTg nativo e irradiado a 1500Gy de Cobalto-60 por via subcutânea.

Para análise da proliferação celular de linfócitos *T helper* ($CD3^+CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) em camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg nativo ou irradiado, realizamos culturas de células esplênicas para o ensaio de CFSE. Houve proliferação celular em todas as células estudadas quando estimuladas com o mitógeno (dados não mostrados). Camundongos BALB/c controle (não imunizados) quando estimulados pelo antígeno de extrato total de *T. gondii* apresentaram 1,3% de proliferação celular esplênica,

onde deste total, 1,1% apresentou fenótipo CD19⁺, 1,1% fenótipo CD3⁺CD4⁺ e 0,8% fenótipo CD3⁺CD8⁺. Camundongos BALB/c imunizados com 03 doses quinzenais do AgTg nativo por via subcutânea quando estimulados pelo antígeno de extrato total de *T. gondii* apresentaram 7,7% de proliferação celular esplênica, e deste total 5,4% apresentaram fenótipo CD19⁺, 4,6% apresentaram fenótipo CD3⁺CD4⁺ e 5,3% apresentaram fenótipo CD3⁺CD8⁺. Camundongos infectados pela cepa cistogênica ME-49 apresentaram 26,5% de proliferação celular, e deste total 30,6% apresentaram fenótipo CD19⁺, 27% apresentaram fenótipo CD3⁺CD4⁺ e 24,3% apresentaram fenótipo CD3⁺CD8⁺. Camundongos BALB/c imunizados com 03 doses quinzenais do AgTg 1500Gy por via subcutânea quando estimulados pelo antígeno de extrato total de *T. gondii* apresentaram 12,2% de proliferação celular esplênica, e deste total 11,4% apresentaram fenótipo CD19⁺, 8,8% apresentaram fenótipo CD3⁺CD4⁺ e 12% apresentaram fenótipo CD3⁺CD8⁺ (Tabela 2)

Tabela 2: Representação da proliferação de células esplênicas de camundongos BALB/c controle, camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg nativo, camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com AgTg 1500Gy e camundongos infectados pela cepa ME-49 marcados com Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) e estimuladas com extrato protéico de *T. gondii*.

Grupos	Proliferação Total	Proliferação Total de linfócitos B (CD19 ⁺)	Proliferação Total de linfócitos T auxiliares CD3 ⁺ CD4 ⁺	Proliferação Total de linfócitos T citotóxicos CD3 ⁺ CD8 ⁺
Controle	1,3%	1,1%	1,1%	0,8%
Imunizados pelo AgTg Nativo	7,7%	5,4%	4,6%	5,3%
Imunizados pelo AgTg 1500Gy	12,2%	11,4%	11,4%	12%
Infectados pela cepa ME-49	26,5%	30,6%	27%	24,3%

6 DISCUSSÃO

Nossos dados como um todo mostram que a irradiação prévia de AgTg funciona efetivamente como um adjuvante convencional melhorando a apresentação e a resposta imune ao antígeno. Isto talvez seja esperado já que há vários anos diversos grupos desenvolvem estudos sobre os efeitos da irradiação sobre protozoários, venenos, toxinas e outros microrganismos para produção de vacinas ou imunógenos (Wales, Kusel, 1992). Muitas das propriedades da radiação sobre proteínas já foram bem caracterizadas quimicamente, como a ação da radiólise da água que pode ser designada como átomos ou moléculas de existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados em orbitais externos. Isto os torna extremamente reativos e capazes de interagir com compostos próximo às orbitas externas, passando a ter funções oxidantes, como o $\text{OH}^\bullet$, ou então redutores de elétrons como o e^- aquoso, o que tornaria as proteínas mais imunogênicas (Wales, Kusel, 1992). Outros autores demonstraram que os produtos oriundos da radiólise da água atuam como catalisadores, ou pontes para originarem reações químicas ou modificações em moléculas, como por exemplo, proteínas, tornando-as menos tóxicas e, portanto mais eficientes em imunizações (Domazou et al., 2009).

Para produção de um antígeno solúvel de taquizoítos de *T. gondii* (AgTg) utilizamos parasitas obtidos a partir do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados. O rendimento de produção de taquizoítos por este método usando a cepa virulenta RH é alto, mas implica em eliminação das células e proteínas que contaminam a preparação e que podem interferir na produção do antígeno (Costa-Silva et al., 2012). Nossa opção de eliminação de componentes insolúveis como debris celulares por centrifugação e passagem por membrana de polycarbonato tornou este antígeno livre de contaminantes e ideal para a extração de antígenos.

Optamos pelo uso de detergentes fracos para a lise dos taquizoítos resultando em um antígeno caracterizado por proteínas solúveis e em algumas proteínas de membrana para que houvesse maior exposição de proteínas de superfície candidatas pelo seu alto poder imunogênico e candidatas potenciais ao desenvolvimento de vacinas como reportado na literatura (Ma et al., 2009). Detergentes mais potentes ou mesmo agentes caotrópicos podem solubilizar mais

proteínas, mas não sabemos se essas proteínas são imunogênicas (Görg et al., 2004). Proteínas estruturais dos agentes podem ser solubilizadas e “diluir” o antígeno com produtos conservados e pouco imunogênicos (Robey et al., 1986). Extratos salinos sem detergente não são imunogênicos na ausência de adjuvantes pela solubilidade das proteínas (Krahenbuhl et al., 1972). Excluimos proteínas de baixo peso molecular após a obtenção do extrato solúvel pelo método de purificação por exclusão molecular obtendo um antígeno caracterizado por proteínas de alto peso molecular. Proteínas e peptídeos pequenos interferem na resposta imune quer seja por formar complexos solúveis quer seja pela menor capacidade de cooperação celular na resposta imune (Geysen et al., 1985). A obtenção de AgTg solúvel da cepa RH é realizada rotineiramente por diversos grupos e resulta em proteínas antigênicas importantes para a proteção da toxoplasmose como demonstrou Ma Gy et al., (2009), ao estudar a antigenicidade de proteínas presentes no antígeno solúvel de *T. gondii*. Nossas preparações continham maior parte dos antígenos do agente e não houve diferença significativa no seu reconhecimento por soro de cepas de outro grupo tipo II ME-49. Existem diferenças antigênicas entre as cepas do tipo I, II ou III, mas são raras e em geral de difícil detecção (Kong et al., 2003). Assim produzimos um antígeno genérico de *T.gondii*, livre de peptídeos e contaminante de baixo peso molecular a partir de taquizoítos purificados de exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados pela cepa RH Tipo I.

A irradiação deste antígeno com doses progressivas mostrou que ocorrem modificações de peso molecular sem perda do reconhecimento antigênico em uma dose ótima. Doses menores não afetam e doses maiores destroem algumas características da proteína irradiada, o que já foi relatado por diversos autores (Nascimento et al., 1996; Cardi et al., 1998; Pinho et al., 1995) inclusive o achado de progressivo borramento das bandas por quebras e agregações. As alterações observadas nos AgTg irradiados sugerem a ação da radiação sobre as proteínas levando a quebras nas cadeias polipeptídicas em consequência da ruptura de pontes covalentes como as observadas por Moon e Song (2001) em proteínas de ovalbumina e ovomucoide que após a radiação por ^{60}Co apresentaram rupturas da estrutura ordenada das proteínas. Além disso, pode ocorrer a formação de agregados das diferentes cadeias polipeptídicas relacionadas aos radicais O_2 formados durante a irradiação (Davies, 1987).

Confirmamos a manutenção da antigenicidade dos AgTg irradiados realizando imunoensaios utilizando as amostras irradiadas e seu reconhecimento por anticorpos. Os ensaios de ELISA, dot-ELISA e Western Blot demonstraram que mesmo após a irradiação por ^{60}CO , os AgTg foram reconhecidos por anticorpos anti-*T. gondii* específicos presentes em soros de animais infectados pela cepa ME-49 ou coelhos hiperimunizados. Isto é esperado porque o reconhecimento dos epítomos utilizam grupamentos de até quinze aminoácidos o que poderia ser encontrado mesmo em proteínas fortemente degradadas (De Nagel, Pierce, 1991). Antígenos irradiados a doses superiores perderam parte da sua capacidade de reconhecimento com uma queda na intensidade nas reações definindo que uma resposta ideal precisa de um ótimo de radiação (Lidbury et al., 1997). Por ser penetrante a radiação γ em teoria pode acertar a proteína em qualquer lugar ao longo da cadeia polipeptídica (Patten, Gordy, 1960). Elétrons excitados ou cargas geradas no sítio da radiação são capazes de viajar ao longo da cadeia dissipando a energia e realizando quebras em ligações frágeis da cadeia polipeptídica. Isso explicaria a diferença de reconhecimento e imunogenicidade apresentadas pelos antígenos de acordo com a dose utilizada (Le Maire et al., 1990).

A maioria dos estudos vacinais em toxoplasmose e resposta imune humoral são avaliados em camundongos imunizados com proteínas recombinantes de fácil obtenção com avanço da biologia molecular, como proteínas de superfície conhecidas como SAGs (Souza et al., 2010); proteínas associadas a invasão do parasita na célula hospedeira como as ROPs (proteínas da rópria), RONs (proteínas da porção basal “pescoço”) (Boothroyd, Dubremetz, 2008), MICs (proteínas do micronema) (Johnson et al., 2007) e GRAs (proteínas dos grânulos densos) (Mercier et al., 2005). Imunizações realizadas pela administração de proteínas recombinantes provocam proteção parcial em diferentes graus. Imunizações realizadas por proteínas recombinantes isoladas demonstram baixa proteção e geralmente associadas a adjuvantes para que ocorra a ativação do sistema imune e produção de anticorpos específicos (Cassan et al., 2011).

Em relação aos aspectos imunológicos analisados, camundongos BALB/c imunizados via subcutânea pelo AgTg irradiado mostraram produção de anticorpos IgG anti *T. gondii* específicos (ELISA) após a imunização adequada sem adjuvante quando comparados ao AgTg nativo. Com o aumento da dose observamos que doses elevadas de irradiação resultaram em perda significativa da imunogenicidade.

Além do aumento na produção de anticorpos específicos, os AgTg irradiados a doses ótimas produziram anticorpos que foram capazes de reconhecer proteínas intactas do agente (Western Blot), em especial o irradiado a 2000 Gy. Nosso modelo de imunização não utilizou adjuvantes para ativação do sistema imune, sendo que os AgTg irradiados a doses ótimas foram capazes de produzir anticorpos específicos pelas modificações após a irradiação. Proteínas irradiadas sofrem modificações diretas ou indiretas pela radiólise da água podendo gerar agregados pela indução da quebra de cadeias polipeptídicas tornando-a mais imunogênica (Nascimento et al., 1996). Estudos com proteína recombinante p18 de *M. leprae* irradiada, demonstraram que o aumento do peso molecular pela agregação de proteínas aumentou o poder imunogênico da proteína induzindo uma melhor resposta imune (Pinho et al., 1995).

Anticorpos de alta afinidade induzidos pela exposição a um antígeno são extremamente importantes para a proteção contra uma reinfecção e para imunidade do hospedeiro ao longo do tempo (Savelyeva et al., 2011). Estudos demonstraram que a memória imunológica e a resposta inicial ao sarampo podem ser prejudicadas pela infecção por HIV, pela deficiência na maturação de avides de anticorpos (Brunel et al., 1995). Nossos resultados demonstram que os anticorpos IgG séricos específicos induzidos por AgTg irradiado a doses ótimas apresentaram maior avides e alta afinidade ao antígeno de extrato total de *T. gondii*, quando comparados aos anticorpos produzidos por antígenos nativos. A partir da imunização por via subcutânea pelo extrato irradiado encontramos uma dose ótima para produção de níveis significativos de IgG de alta afinidade no soro dos animais imunizados, com melhor maturação da resposta imune.

A partir dos dados obtidos analisamos a imunidade celular e a proteção utilizando dose ótima, intermediária as duas melhores nesse estudo dose resposta inicial. A manutenção da antigenicidade do AgTg irradiado a 1500 Gy foi observada por ELISA, dot-ELISA e Western Blot. Camundongos imunizados por via subcutânea pelo AgTg irradiado a dose ótima produziram anticorpos que foram capazes de reconhecer anticorpos específicos anti-*T.gondii* em soro de animais previamente infectados pela cepa ME-49 (ELISA, dot-ELISA) e bandas intactas do agente (Western blot). O uso da radiação ionizante manteve as propriedades antigênicas originais, mas com melhor resposta imune, com produção de anticorpos altamente responsivos (Nascimento et al., 1996). Estudos realizados utilizando crotoxina

irradiada por ^{60}CO demonstraram que os agregados induzidos pela irradiação se tornam altamente imunogênicos, induzindo uma melhor resposta (Cardi et al., 1998a). O AgTg irradiado foi capaz de imunizar animais e induzir produção de anticorpos capazes de reconhecer antígenos de *T. gondii*. A avidéz de anticorpos dos animais imunizados pelo AgTg irradiado a dose ótima também se apresentou maior quando comparadas a de animais imunizados pelo AgTg em sua forma nativa. Nossos dados corroboram aos encontrados por Cardi et al., (1998b) após a irradiação de crotoxina de *Crotalus durissus* com ^{60}CO , demonstrando que a irradiação ionizante atua na estrutura da proteína estimulando o sistema imune a reconhecer moléculas que anteriormente apresentavam pouca antigenicidade, permitindo melhor maturação imune. Após irradiação com 1500Gy, o antígeno íntegro e livre de peptídeos, foi capaz de imunizar animais e estimular a produção de anticorpos capazes de reconhecer antígenos de diferentes cepas de *T.gondii*, por ELISA, dot-ELISA ou Western Blot. A produção de anticorpos foi maior e de maior avidéz quando comparada a de animais imunizados com antígeno não irradiado.

Para a resposta imune celular, camundongos imunizados via subcutânea pelo AgTg irradiado a dose ótima quando comparado a imunizados com antígeno nativo. A resposta do anticorpo a um antígeno requer uma cooperação sináptica entre as células APC e os linfócitos B e CD4 *helper* específicas para uma mesma molécula do antígeno (Xie et al, 2013). Em nosso estudo, as modificações ocorridas nas proteínas após a irradiação resultaram em maior número de células responsivas ao antígeno. Isto seria explicado pelo fato de que células B que são APC eficientes na ligação inicial do antígeno ao anticorpo (Gosselin et al., 1988). Alguns autores questionam a eficiência da radiação alegando que proteínas modificadas apenas induzem anticorpos contra os epítomos modificados e haveria perda do reconhecimento antigênico cruzado (Abraham et al., 1995). Foi possível observar que os anticorpos produzidos reconheciam as proteínas habituais do *T.gondii* o que é lógico. Receptores de células T estimulados por estas associações podem fazer contato tanto com os epítomos antigênicos normais quanto com os modificados e os receptores de célula T estimulados por estas associações podem fazer contatos com antígenos normais e irradiados (Hoffman et al., 1990; Wales, Kusel, 1992). Demonstramos que subconjuntos de células T responderam ao epítomo irradiado aumentando a capacidade protetora, pelo maior número de células CD8 responsivas ao antígeno. A resposta proliferativa das células estimuladas pelo antígeno foi

inferior ao encontrado em animais infectados, mas isto pode ser explicado pelo fato de que o desafio foi feito com 03 doses pulsadas do antígeno, o que geralmente resulta em menor imunidade do que a infecção natural.

A imunidade na toxoplasmose é complexa e uma vacina deve ter dois aspectos relevantes, contra a infecção e contra a doença (Zorgi et al, 2011). Para a doença, a proteção implica na produção de linfócitos CD8 específicos, como relatado em diversos modelos experimentais (Mendes et al., 2011). Para prevenir a invasão são necessários anticorpos e proteção de mucosas, tanto para produção de oocistos (Meireles et al., 2008) quanto para prevenção da infecção (Zorgi et al., 2011). A produção e a qualidade dos anticorpos estão diretamente relacionados ao estabelecimento de células B de memória (Bergmann et al., 2013), e nossos dados também mostraram que nossa imunização é muito mais eficiente na criação destas células.

Para verificar a proteção induzida pela imunização com AgTg irradiado, desafiamos os camundongos imunizados com diferentes cepas do parasita. Na toxoplasmose, a proteção pode ser mensurada pela ausência do agente na prevenção da infecção ou contra a doença pelo menor número de agentes no hospedeiro (Hiramoto et al, 2002). Avaliando a proteção em relação a doença, camundongos imunizados via subcutânea pelo AgTg irradiado e desafiados pela cepa ME-49 apresentaram uma menor quantidade DNA de cistos de *T. gondii* no cérebro, quando comparados com camundongos que não foram imunizados. A maioria dos autores utilizam desafios com cepas menos virulentas do parasita e geralmente produtoras de cistos (Song et al., 1991), evitando o stress do teste com cepa virulenta, como a RH onde ocorre apenas um retardo na mortalidade e não uma proteção efetiva, como também ocorreu em nosso trabalho. Desafiamos os animais imunizados pelo AgTg irradiado por via intraperitoneal com 100 x a dose letal após a imunização e encontramos um prolongamento da sobrevida significativa. A administração parenteral do agente sobrepõe-se aos mecanismos de proteção usual encontrados nas mucosas da infecção natural (Mack , McLeod, 1992). Dentre os camundongos imunizados pelo AgTg irradiado houve apenas uma morte 10 dias após o desafio pela cepa RH virulenta, quando todos os animais não imunizados já haviam morrido. Nossos dados demonstram que o uso do antígeno solúvel associado a radiação ionizante aumentaram a sobrevida de camundongos desafiados via intraperitoneal com taquizoitos da cepa letal RH do tipo I e diminui o

número de cistos cerebrais quando desafiados com a cepa cistogênica não letal ME-49 do tipo II detectadas por PCR em tempo real.

Atualmente a única vacina estéril existente contra protozoários do filo Apicomplexa foi produzida pela radiação ionizante, representando a primeira geração de vacinas atenuadas pela exposição a radiação. Desde 1970 (Hansen et al., 1979) estudos em humanos demonstram que esporozoítos atenuados pela radiação são potentes indutores de imunidade protetora e se tratam de imunógenos seguros pois não dão origem as infecções eritrocitárias na fase assexuada na infecção por malária (Hoffman et al., 2002; Luke et al., 2003). Assim como observamos em nossos resultados, os estudos para a produção da vacina contra malária demonstram um foco importante no processo de desenvolvimento do imunógeno, que foi a determinação da dose ótima de radiação para que houvesse uma atenuação adequada dos esporozoítos e indução de uma imunidade protetora ideal (Mishra et al, 2011) de modo que a determinação do ótimo de radiação explica porque os dados com radiação são frequentemente conflitantes. O uso indiscriminado da radiação não ajuda na imunogenicidade, como pode ser visto com doses maiores de radiação em nosso trabalho, mas a busca de uma dose ideal foi importante em vários outros modelos, gerando uma possibilidade de desenvolvimento de vacinas, especialmente com parasitas íntegros (Hiramoto et al, 2002; Zorgi et al, 2011). O uso de parasitas irradiados vem amplamente sendo estudado com o objetivo de produzir vacinas (Wales , Kusel 1992). Ovos de miracídios *Schistosoma mansoni* foram irradiados a doses de 5 a 2000Gy. Ovos irradiados a doses de 100 a 200 e miracídios a doses de 10 a 500, penetravam em caramujos mas não eram capazes de se desenvolver. Estudos utilizando *Trypanosoma cruzi* irradiados como inóculo de camundongos foram dependentes da dose de radiação escolhida, do poder infectante da cepa, da via de inóculo e do número de organismos inoculados (Martinez-Silva 1969). Formas proliferativas da cepa RH foram irradiadas a doses de 50, 100 e 200 Gy por fonte de ^{60}Co e posteriormente inoculados em camundongos. Inóculos de 10^4 e 10^6 parasitas irradiados a 50 e 100Gy resultaram na morte dos animais após 10 dias, enquanto os irradiados a 150 e 200Gy não apresentaram mortes. Os animais sobreviventes inoculados pelos parasitas irradiados foram desafiados por parasitas normais e a sobrevivência foi dependente da quantidade de inóculo (Bakal, Veld, 1969). Camundongos infectados pela cepa virulenta de *Leishmania donovani* e tratados 75

dias após por parasitas irradiados por radiação γ e uma segunda imunização 15 dias após a primeira, demonstraram proteção contra kala-azar com redução estimada de *Leishmania donovani* presentes no baço e no fígado. O grupo de animais imunizados também apresentaram regressão da doença (Datta et al., 2012).

Nosso trabalho baseou-se no conceito de que se os parasitas íntegros forneceriam uma boa imunidade, a irradiação de extratos do agente também poderia ser efetiva na indução de imunidade protetora, como observamos. Estudos sobre a radiação ionizante são amplamente realizados em venenos já que são constituídos basicamente proteínas. Guarnieri (1992) verificou o efeito da radiação γ em veneno de *Bothrops jararaca*, observando que o veneno irradiado diminuía o foco da hemorragia. Em 2003, Oliveira comparou o veneno de *Bothrops jararaca* nativo e irradiado por radiação γ . Caprinos imunizados pelo veneno nativo apresentaram formação de edema enquanto os animais imunizados pelo veneno irradiado não apresentaram sinais de inchaço. Estudos sobre os efeitos tóxicos e imunológicos do veneno de *Androctonus australis hector* irradiado por duas doses de irradiação γ (1 e 2 kGy) demonstraram que após a radiação o veneno ainda se apresentou imunogênico e os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer o veneno nativo. Os anti-soros produzidos contra a toxina tinham uma maior capacidade de neutralização e imunorreatividade contra todos os componentes do veneno nativo. Camundongos imunizados pelo veneno de *Androctonus australis hector* irradiado foram capazes de resistir a doses letais do veneno nativo (Abib, Djebbari 2003). Nossos dados corroboraram a melhor imunogenicidade de antígenos irradiados de *T.gondii*, desde que numa dose ideal de radiação.

Atualmente a única vacina utilizada para a toxoplasmose, comercialmente e para uso veterinário, é a Toxovax®, produzida a partir da cepa S48 que após sucessivas passagens em camundongos diminuiu sua habilidade de formar cistos teciduais. Trata-se de uma vacina viva e amplamente utilizada no Reino Unido e na Nova Zelândia, prevenindo o aborto de ovinos e com proteção de até 18 meses com a recomendação de que se revacinem anualmente (Buxton et al., 1993). Por se tratar de uma vacina que apresenta alto custo e alguns efeitos secundários como vida útil curta para imunização do rebanho e a possibilidade de reversão para cepa patogênica, seu uso em humanos fica totalmente inviável. No entanto, estudos futuros devem focar em antígenos alvo e maneiras de tornar este antígeno melhor

apresentado como estratégia ideal para estimular a imunidade, e o grande desafio ainda reside na falta de candidatos a imunógenos de vacina eficazes. A maioria dos imunógenos encontrados são associados a adjuvantes, considerados como parte indispensável na produção de uma vacina por desempenhar um papel crítico na melhoria de imunógenos fracos a ativarem uma resposta imunológica adequada segura e sem aumento da administração de doses.

Proteínas solúveis e antígenos brutos são considerados pouco eficazes e geram uma resposta imune limitada, por isso na sua maioria são administradas junto a adjuvantes para que se tornem imunógenos eficazes. Estudos realizados com proteínas submetidas à radiação γ , tem mostrado a eficiência do método como ferramenta na melhoria de imunógenos, somados a vantagem de não se adicionar nenhuma outra molécula a amostra durante o processo, como o uso de agentes físicos ou químicos e a melhoria da antigenicidade de diversas proteínas (De Gregorio et al., 2013). A destruição de aminoácidos, o rompimento de cadeias polipeptídicas, alterações de ligações intramoleculares e a reorganização da molécula da proteína por agregação podem ser algumas das alterações que podem ocorrer, levando a mudanças em suas propriedades biológicas.

A resposta imune é um processo complexo que envolve o reconhecimento e a internalização de antígenos por células apresentadoras de antígeno. Macrófagos são extremamente importantes neste evento como células apresentadoras de antígeno, junto a outras funções imunes. Além de inúmeros receptores de superfície estas células possuem receptores *Scaveger*, os quais foram descritos pela primeira vez por Goldstein e Brown em 1979 como receptores de membrana de macrófagos que se ligam e internalizam lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL). Estes receptores estariam relacionados a epítomos específicos gerado pela oxidação do LDL nativo, permitindo sua distinção entre moléculas endógenas inalteradas de moléculas endógenas alteradas (Greaves, Gordon 2009). Em um estudo de receptores celulares e inibição por probucol, foi demonstrado que a crotoxina irradiada era reconhecida preferentemente por *Scavengers receptors* em macrófago peritoneais (Cardi et al, 1998), numa época anterior ao conhecimento sobre scavengers receptores.

Os receptores *Scavengers* são muito heterogêneos, subdivididos em classes com características estruturais e ações diferentes e até mesmo superfamílias devido as suas propriedades funcionais comuns. Em geral esses receptores removem

moléculas indesejáveis através do reconhecimento de modificações, como por exemplo células apoptóticas, detritos minerais, proteínas modificadas, adesão celular e apresentação de antígenos (Santiago-García et al., 2003). Estudos sobre a captação de crotoxina irradiada por macrófagos peritoniais de camundongos demonstraram que a crotoxina irradiada era mais facilmente fagocitada pelas células do que a crotoxina nativa, e o uso de probucol para o bloqueio de células especializadas diminuiu o reconhecimento da crotoxina irradiada (Cardi et al., 1998). A associação de receptores Scavenger a estas captações e aos resultados de melhor resposta imune humoral e celular obtidos em nosso trabalho poderiam estar associadas a um Scavenger de classe A denominado MARCO, localizado na superfície da membrana celular e em vesículas endocíticas responsável pelo reconhecimento de proteínas modificadas (Canton et al., 2013). Este receptor poderia ser o essencial para o reconhecimento de proteínas modificadas pela radiação ionizante e resultaria na melhor apresentação de antígenos de proteínas irradiadas, como o observado em nosso estudo.

Os resultados encontrados em vacinas até hoje estão relacionados ao fato do pouco espectro de antígenos como ocorre na infecção natural, o que seria obtido pelo uso de extrato total, por isso proteínas recombinantes induzem menor imunidade como um todo. Proteínas recombinantes são pouco imunogênicas e apresentam epítomos pouco seletivos. As modificações causadas pela radiação com produção de radicais livres poderiam representar uma forma seletiva no reconhecimento por células apresentadoras de antígeno já que estas agem sobre polimorfonucleares e células fagocíticas produtoras de radicais livres.

Produzir uma vacina para uma doença não letal tem implicações modernas, mas não era considerado importante no passado. Hoje com a diminuição da natalidade e do tamanho das famílias, um novo pensamento sanitário incluiu estas doenças num rol de proteção maior. Nem sempre é desejável uma vacina para uso humano específico, mas grupos de risco, como pacientes HIV ou gestante de risco poderiam ser vacinados. Mais importante talvez fosse a vacinação indiscriminada do hospedeiro definitivo, o gato, diminuindo a produção de oocistos e assim a contaminação de água e verduras. Isso indiretamente também resultaria na menor contaminação de pastagens e de ruminantes cuja carne é usada para consumo humano. Nossa proposta se insere nesse segmento, já que a produção de extratos antigênicos irradiados é relativamente de baixo custo e de fácil conservação,

diferente do que ocorre em vacina com parasitas íntegros que dependem de uma intrincada rede de frio para sua conservação.

Obviamente, este é um primeiro estágio do desenvolvimento de vacinas, mostrando a potencialidade da irradiação ionizante sobre proteínas do agente e sua eficiência maior para a indução de memória imunológica. Nosso projeto original pretendia o aprimoramento de uma proteína recombinante, mas fomos instados a optar pelo extrato total de estudo, por sugestão da banca de qualificação. Hoje proteínas recombinantes são propostas em construções híbridas (Yin Y et al., 2013) ou associações (Wu et al., 2013), mas continuam a falhar na indução de uma proteção que justifique uma vacina de saúde pública. O processamento pela radiação numa dose ideal pode ser uma ferramenta que vá gerar um aprimoramento destas construções permitindo alcançar uma proteção que justifique o uso de uma vacina de toxoplasmose em saúde pública.

7 CONCLUSÕES

7.1 Gerais

A irradiação do extrato solúvel de taquizoítos de *T.gondii* por raios gamma de 60-Cobalto apresentou alterações moleculares discretas. O antígeno irradiado a uma dose de 1500Gy mostrou boa imunogenicidade tanto humoral como celular em camundongos BALB/c imunizados, apresentando uma proteção significativa após desafios com cepa RH virulenta (tipo I) ou cepa ME-49 cistogênica (tipo II) de *T. gondii*.

7.2 Específicas

- ✓ Produzimos antígeno íntegro livre de peptídeos e contaminantes de baixo peso molecular a partir de taquizoítos purificados de exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados pela cepa RH (Tipo I);
- ✓ Após irradiação com raios- γ de Cobalto-60, houve uma degradação e agregação dos antígenos, de forma dose resposta, mas sua antigenicidade foi mantida por ELISA, dot-blot e imuno-marcação de SDS-PAGE. As maiores doses de irradiação com menor efeito significativo na antigenicidade foram 1000 e 2000 Gy.
- ✓ Quanto à imunogenicidade em camundongos imunizados com antígenos irradiados,
 - ✓ Doses de 1000 e 2000Gy mostraram crescimento progressivo na produção de anticorpos específicos (ELISA);
 - ✓ A maturação da resposta imune expressa pela alta avidéz de anticorpos se mostrou melhor a estas doses;
 - ✓ A 4000Gy houve perda significativa da imunogenicidade;
 - ✓ Os anticorpos produzidos pelos antígenos irradiados reconheceram as proteínas intactas do agente, por imuno-marcação de SDS-PAGE, em especial os induzidos por antígenos irradiados com 2000Gy;

- ✓ Após irradiação com 1500Gy, o antígeno íntegro e livre de peptídeos foi capaz de imunizar animais produzindo anticorpos que reconheceram antígenos de diferentes cepas de *T.gondii*, por ELISA, dot-blot ou imunomarcação de SDS-PAGE. A produção de anticorpos foi maior e de maior avidéz quando comparada a de animais imunizados com antígeno não irradiado;
- ✓ Animais imunizados com este antígeno apresentaram uma maior resposta imune celular, quando células esplênicas foram colocadas em cultura na presença de antígeno, e em relação a animais imunizados com antígeno não irradiado, mostraram uma produção maior de célula B de memória e de células CD4⁺ ou CD8⁺, embora menor que a infecção natural;
- ✓ Animais imunizados com este antígeno apresentaram uma maior sobrevida a desafio parenteral com taquizoítos da cepa letal RH (Tipo I) e menor número de cistos cerebrais quando desafiados com a cepa cistogênica não letal ME-49(Tipo II), detectado por PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS*

- Abib L, Laraba-Djebari F. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. Can J Physiol Pharmacol. 2003; 81(12):1118-24.
- Abraham R, Singh N, Mukhopadhyay A, Basu SK, Bal V, Rath S. Modulation of immunogenicity and antigenicity of proteins by maleylation to target scavenger receptors on macrophages. J Immunol. 1995; 154(1):1-8.
- Adams LB, Soileau NA, Battista JR, Krahenbuhl JL. Inhibition of metabolism and growth of *Mycobacterium leprae* by gamma irradiation. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2000; 68(1):1-10.
- Andersson K, Wrammert J, Leanderson T. Affinity selection and repertoire shift: paradoxes as a consequence of somatic mutation Immunol Rev. 1998; 162:173–82.
- Andrew P, Lee W. Innate Immunity and Vaccines. Curr Top Med Chem. 2013.
- Araujo FG. Depletion of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. Infect Immun. 1991;59(5):1614-9.
- Bakal PM, in 't Veld N. Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strain RH. Z Parasitenkd. 1979; 59(3):211-7.
- Bergmann B, Grimsholm O, Thorarinsdottir K, Ren W, Jirholt P, Gjertsson I, Martensson IL. Memory B cells in mouse models. Scand J Immunol. 2013; 78(2):149-56.
- Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. Nat Rev Microbiol. 2008; (1):79-88. Review.
- Bout D, Moretto M, Dimier-Poisson I, Gatel DB. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. Immunobiology. 1999; (2):225-8. Review.
- 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; 72:248-54.
- Brunell PA, Vimal V, Sandu M, Courville TM, Daar E, Israele V. Abnormalities of measles antibody response in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995; 10(5):540-8.

* 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>

Brito LA, Malyala P, O'Hagan DT. Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. *Semin Immunol.* 2013; (2):130-45.

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

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

Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; (9):621-34.

Cardi BA, Andrade HF Jr, Rogero JR, Nascimento N. Differential biodistribution of native and 2 kGy ⁶⁰Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. *Nat Toxins.* 1998a; 6(1):19-25.

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

Cassan SC, Forbes EK, Douglas AD, Milicic A, Singh B, Gupta P, Chauhan VS, Chitnis CE, Gilbert SC, Hill AV, Draper SJ. The requirement for potent adjuvants to enhance the immunogenicity and protective efficacy of protein vaccines can be overcome by prior immunization with a recombinant adenovirus. *J Immunol.* 2011; 187(5):2602-16.

Clapp T, Siebert P, Chen D, Jones Braun L. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability. *J Pharm Sci.* 2011; 100(2):388-401.

Clumeck N, Sonnet J, Taelman H, Cran S, Henrivaux P. Acquired immune deficiency syndrome in Belgium and its relation to Central Africa. *Ann N Y Acad Sci.* 1984; 437:264-9.

Cole GA. Interferon-gamma ELISPOT assay for the quantitative measurement of antigen-specific murine CD8+ T-cells. *Methods Mol Biol.* 2005; 302:191-204.

Crawford J, Lamb E, Wasmuth J, Grujic O, Grigg ME, Boulanger MJ. Structural and functional characterization of SporoSAG: a SAG2-related surface antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 2010; 285(16):12063-70.

da Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. *Exp Parasitol.* 2012; 130(4):463-9.

Datta S, Manna M, Khanra S, Ghosh M, Bhar R, Chakraborty A, Roy S. Therapeutic immunization with radio-attenuated *Leishmania* parasites through i.m. route revealed protection against the experimental murine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2012; 111(1):361-9.

Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*. 1987; 262(20):9895-901.

De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol*. 2013; 4:214.

De Nagel DC, Pierce SK. Heat shock proteins implicated in antigen processing and presentation. *Semin Immunol*. 1991; 3(1):65-71.

Denkers EY, Sher A, Gazzinelli RT. CD8⁺ T-cell interactions with *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. *Res Immunol*. 1993; 144(1):51-7. Review.

Do Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon*. 1996; 34(1):123-31.

Domazou, AS; Koppenol, WH; Gebicki, JM. Efficient repair of protein radicals by ascorbate. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46:1049–57.

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

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; (2):267-99. Review.

Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol*. 1998 (1):27-30. Review.

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

Fachado A, Rodriguez A, Molina J, Silvério JC, Marino AP, Pinto LM, Angel SO, Infante JF, Traub-Cseko Y, Amendoeira RR, Lannes-Vieira J. Long-term protective immune response elicited by vaccination with an expression genomic library of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2003; 71(9):5407-11.

Feng CG, Sher A. Parasites paralyze cellular host defense system to promote virulence. *Cell Host Microbe*. 2010; 16; 8(6):463-4.

Fraser CK, Diener KR, Brown MP, Hayball JD. Improving vaccines by incorporating immunological coadjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2007; (4):559-78. Review.

Frenkel JK, Ambroise-Thomas P. Genomic drift of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 1997; 83(1):1-5. Review.

Freyre A, Bonino J, Falcón J, Castells D, Correa O, Casaretto A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet Parasitol.* 1999; 81(1):85-8.

Frickel EM, Sahoo N, Hopp J, Gubbels MJ, Craver MP, Knoll LJ, Ploegh HL, Grotenbreg GM. Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes. *J Infect Dis.* 2008; 198(11):1625-33.

Fusco G, Rinaldi L, Guarino A, Proroga YT, Pesce A, Giuseppina de M, Cringoli G. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Vet Parasitol.* 2007; 149(3-4):271-4.

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; 1;146(1):286-92.

Geysen HM, Barteling SJ, Meloen RH. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(1):178-82.

Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia. *Annu Rev Genet.* 1979; 13:259-89. Review.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004; (12):3665-85. Review. Erratum in: *Proteomics.* 2005; (3):826-7.

Gosselin EJ, Tony HP, Parker DC. Characterization of antigen processing and presentation by resting B lymphocytes. *J Immunol.* 1998; 140(5):1408-13.

Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, Petersen E, Gilbert R; European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr.* 2005; 94(12):1721-31.

Gray D, Matzinger P. T cell memory is short-lived in the absence of antigen. *J Exp Med.* 1991; 174(5):969-974.

Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res.* 2009 ; 50 Suppl:S282-6.

Guarnieri MC. Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰CO nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas de *Bothrops jararaca*. [Tese (Doutorado)]. Instituto de Pesquisas Energéticas, Comissão Nacional de Energia Nuclear, São Paulo, 1992.

Guimarães ACS, Kawarabay M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade JR HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev. Inst Med Trop S Paulo.* 1993; 35(6): 479-483.

Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(7):505-17. Review.

Håkansson S, Charron AJ, Sibley LD. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 2001; 20(12):3132-44.

Hansen R, deSilva S, Strickland GT. Antisporozoite antibodies in mice immunized with irradiation-attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73(5):574-8.

Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1504(2-3):196-219. Review.

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

Hiramoto RM, Mayrbaur-Borges M, Galisteo AJ Jr, Meireles LR, Macre MS, Andrade HF Jr. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. *Rev Saúde Pública.* 2001; 35(2):113-8.

Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(10):971-4. Review.

Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacci J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR, Richie TL. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis.* 2002; 185(8):1155-64.

Hunter CA, Subauste CS, Remington JS. The role of cytokines in toxoplasmosis. *Biotherapy.* 1994; 7(3-4):237-47. Review.

Johnson TM, Rajfur z, Jacobson K, et al. Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell.* 2007; 18:3039-46.

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

Joynson DH. Epidemiology of toxoplasmosis in the U.K. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1992; 84:65-9. Review.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(4):251-62.

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;148(5):1493-8.

Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol.* 1991; 15; 147(10):3501-6.

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

Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis.* 2003; 1;187(9):1484-95.

Krahenbuhl JL, Ruskin J, Remington JS. The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1972; 108(2):425-31.

Kravetz J. Congenital toxoplasmosis. *Clin Evid (Online).* 2013.

Le Maire M, Thauvette L, de Foresta B, Viel A, Beauregard G, Potier M. Effects of ionizing radiations on proteins. Evidence of non-random fragmentations and a caution in the use of the method for determination of molecular mass. *Biochem J.* 1990;267(2):431-9.

Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(30):11423-8.

Letscher-Bru V, Villard O, Risse B, Zauke M, Klein JP, Kien TT. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infect Immun.* 1998;66(9):4503-6.

Lidbury BA, Grissell TV, Sizer PJ, Pang GT, Clancy R, Cripps AW. Erythrocytes enhance the immunogenicity of oral vaccination with gamma irradiated influenza virus: increasing the dose of irradiation results in a significant diminution of lung IgA response. *Vaccine.* 1997; (14):1529-37.

Lu F, Huang S, Kasper LH. Interleukin-10 and pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infect Immun.* 2003;71(12):7159-63.

Luke TC, Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol.* 2003; 206(Pt 21):3803-8. Review.

Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods.* 2000; 243(1-2):147-54.

Ma GY, Zhang JZ, Yin GR, Zhang JH, Meng XL, Zhao F. *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. *Exp Parasitol.* 2009; 122(1):41-6.

Machado AS, Andrade GM, Januário JN, Fernandes MD, Carneiro AC, Carneiro M, Carellos EV, Romanelli RM, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RW. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(6):757-61.

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

Martínez-Silva R, López VA, Colón JI, Chiriboga J. *Trypanosoma cruzi*: effects of gamma radiation on growth and infectivity. Exp Parasitol. 1969 Aug;25(1):162-70.

McLeod R, Frenkel JK, Estes RG, Mack DG, Eisenhauer PB, Gibori G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. J Immunol. 1988; 140(5):1632-7.

Meerburg BG, Kijlstra A. [Zoonotic risk of rodents in livestock production]. Tijdschr Diergeneesk. 2006; 131(12):445-7.

Meireles LR, Tsutsui VS, Carmo CV, Galisteo AJ Jr, Hiramoto RM, Terentowicz HC, Andrade Jr HF. Quantitative *Toxoplasma gondii* oocyst detection by a modified Kato Katz test using Kinyoun staining (KKK) in ME49 strain experimentally infected cats. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008 May-Jun;50(3):187-90.

Meireles LR. Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo. [Dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2001.

Mendes EA, Caetano BC, Penido ML, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT. MyD88-dependent protective immunity elicited by adenovirus 5 expressing the surface antigen 1 from *Toxoplasma gondii* is mediated by CD8(+) T lymphocytes. Vaccine. 2011; 29(27):4476-84.

Mercier C, Adjogble KD, Däubener W, et al. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? Int J Parasitol. 2005; 35:829-49.

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; 41(4):49.

Michaels HB, Hunt JW. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. Radiat Res. 1978; 74(1):23-34.

Mishima M, Xuan X, Nishikawa Y, Makala L, Yokoyama N, Nagasawa H, Mikami T. Construction of recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* surface antigen 1. Mol Biochem Parasitol. 2001; 117(1):103-6.

Mishra S, Rai U, Shiratsuchi T, Li X, Vanloubbeeck Y, Cohen J, Nussenzweig RS, Winzeler EA, Tsuji M, Nussenzweig V. Identification of non-CSP antigens bearing CD8 epitopes in mice immunized with irradiated sporozoites. *Vaccine*. 2011; 29(43):7335-42

Mitkus RJ, King DB, Hess MA, Forshee RA, Walderhaug MO. Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination. *Vaccine*. 2011; 29(51):9538-43.

Moon S, Song KB. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. *Food Chem*. 2001; 74:479-83.

Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med*. 1999; 190(12):1783-92.

Mount A, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E, Morelli AB. Combination of adjuvants: the future of vaccine design. *Expert Rev Vaccines*. 2013; 12(7):733-46.

Okada R, Kondo T, Matsuki F, Takata H, Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4⁺T cell subsets and their differentiation. *Int Immunol*. 2008; 20(9): 1189-99.

Oliveira PCL. Estudo comparativo do veneno botrópico (*Bothrops jararaca*) nativo e irradiado com ⁶⁰CO em caprinos. Aspectos clínicos e laboratoriais. São Paulo, 2003, 98p. Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Passos, LN, Araújo-Filho, OF, Andrade Jr, HF. Toxoplasma encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 2000 42(3):141-145.

Patten F, Gordy W. Temperature effects on free radical formation and electron migration in irradiates proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1960; 46(8):1137-44.

Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J. Immunization with E. coli produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*. 1998 Aug; 16(13):1283-9.

Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC. *Toxoplasma gondii*: growth in the absence of host cell protein synthesis. *Exp Parasitol*. 1981; 52(1):129-36.

Pichichero ME. Booster vaccinations: can immunologic memory outpace disease pathogenesis? *Pediatrics*. 2009; 124(6):1633-41. doi: 10.1542/peds.2008-3645. Epub 2009 Nov 23. Review.

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

Pinho JR, Cardi BA, Andrade HF Jr, Barr PJ, Bathurst IC, Vicente EJ, Schenberg AC. Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-kDa antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1995; 63(3):381-90.

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

Riese P, Schulze K, Ebensen T, Prochnow B, Guzmán CA. Vaccine Adjuvants: Key Tools For Innovative Vaccine Design. Curr Top Med Chem. 2013.

Robey WG, Arthur LO, Matthews TJ, Langlois A, Copeland TD, Lerche NW, Oroszlan S, Bolognesi DP, Gilden RV, Fischinger PJ. Prospect for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120-kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83(18):7023-7.

Robinson SA, Smith JE, Millner PA. *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): in vitro analysis of host cell binding. Parasitology. 2004; 128(Pt4):391-6.

Rorman E, Zamir CS, Rilkis I, Ben-David H. Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. Reprod Toxicol. 2006; 21(4):458-72. Review.

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

Santiago-García J, Kodama T, Pitas RE. The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. J Biol Chem. 2003; 278(9):6942-6.

Santos, AH, Pinheiro, CE, Jordano, MS. Aids as underlying and associated causes of death, State of S. Paulo Brazil, 1998. Rev. Saúde Pública, 2000; 34(6):581-588.

Savelyeva N, Shipton M, Suchacki A, Babbage G, Stevenson FK. High-affinity memory B cells induced by conjugate vaccines against weak tumor antigens are vulnerable to nonconjugated antigen. Blood. 2011; 118(3):650-9.

Schlüter D, Deckert-Schlüter M, Lorenz E, Meyer T, Röllinghoff M, Bogdan C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. J Immunol. 1999; 162(6):3512-8.

Schmidt AG, Xu H, Khan AR, O'Donnell T, Khurana S, King LR, Manischewitz J, Golding H, Suphaphiphat P, Carfi A, Settembre EC, Dormitzer PR, Kepler TB, Zhang R, Moody MA, Haynes BF, Liao HX, Shaw DE, Harrison SC. Preconfiguration of the antigen-binding site during affinity maturation of a broadly neutralizing influenza virus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(1):264-9.

Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J*. 2012; 11:11. doi:10.1186/1475-2875-11-11. Review.

Sibley LD, Pfefferkorn ER, Boothroyd JC. Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*. 1993; 9(10):392-5.

Siegrist CA. Vaccine immunology. In: Plotkin SA, Orestein WA, Offit PA, editors *Vaccines*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2012. p. 17-36.

Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*. 2003; 33(5-6):469-78. Review.

Sobral CA, Amendoeira MR, Teva A, Patel BN, Klein CH. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72(1):37-41.

Song CC, Yuan XZ, Shen LY, Gan XX, Ding JZ, Duan YF. Studies on the use of cobalt-60 irradiation to control infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1991; 22 Suppl:115-9.

Souza W, Martins-Duarte ES, Lembgruber L, Attias M, Vommaro RC. *Structural organization of the tachyzoite of Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica* 2010; (20)1-131-143. Review.

Stefanić I, Ljubić I, Bonifacić M, Sabljic A, Asmus KD, Armstrong DA. A surprisingly complex aqueous chemistry of the simplest amino acid. A pulse radiolysis and theoretical study on H/D kinetic isotope effects in the reaction of glycine anions with hydroxyl radicals. *Phys Chem Chem Phys*. 2009; 11(13):2256-67.

Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods*. 1989; 119(2):153-87. Review.

Suaréz-Aranda F, Galisteo AJ, Hiramoto RM, Cardoso RP, Meireles LR, Miguel O, Andrade HF Jr. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Vet Parasitol*. 2000; 91(1-2):23-32.

Subauste CS, Dawson L, Remington JS. Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*. 1992; 176(6):1511-9.

Suzuki Y, Remington JS. Importance of membrane-bound antigens of *Toxoplasma gondii* and their fixation for serodiagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol. 1990; 28(10):2354-6.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76(9):4350-4.

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

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

Wu D, Ji S, Hu T. Development of pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine with long spacer arm. Vaccine. 2013.

Wu K, Chen XG, Li H, Yan H, Yang PL, Lun ZR, Zhu XQ. Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64(3):261-6.

Xie J, Tato CM, Davis MM. How the immune system talks to itself: the varied role of synapses. Immunol Rev. 2013; 251(1):65-79. doi: 10.1111/imr.12017.

Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, Gazzinelli RT, Belfort R Jr, Rizzo LV. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. J Infect Dis. 2000; 181(6):2018-22.

Yap GS, Sher A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. J Exp Med. 1999; 189(7):1083-92.

Yin Y, Zhang S, Cai C, Zhang J, Dong D, Guo Q, Fu L, Xu J, Chen W. Deletion modification enhances anthrax specific immunity and protective efficacy of a hepatitis B core particle-based anthrax epitope vaccine. Immunobiology. 2013.

Zhang Q, Bagrade L, Bernatoniene J, et al. Low CD4 T cell immunity to pneumolysin is associated with nasopharyngeal carriage of pneumococci in children [published correction appears in J Infect Dis. 2008;197(9): 1354]. J Infect Dis. 2007;195(8):1194–202.

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; 138(2):187-96.