Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Andrea da Costa

Mecanismo de reconhecimento e processamento imune de antígenos aprimorados por radiação gama na toxoplasmose.

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

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

São Paulo 2019 Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Andrea da Costa

Mecanismo de reconhecimento e processamento imune de antígenos aprimorados por radiação gama na toxoplasmose.

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

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

São Paulo 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Costa, Andrea da

Mecanismo de reconhecimento e processamento imune de antígenos aprimorados por radiação gama na toxoplasmose / Andrea da Costa. – São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Heitor Franco de Andrade Júnior

Descritores: 1. TOXOPLASMA GONDII. 2. VACINAS. 3. ANTÍGENOS. 4. RECEPTORES DE ANTÍGENOS. 5. RADIAÇÃO IONIZANTE. 6. PROTEÍNAS.

USP/IMTSP/BIB-05/2019.

Dedico este trabalho, em especial para meus pais, *José Amadeus da Costa*, e *Josimeire da Costa*. Tenham a certeza absoluta, que sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por todo amor, suporte, amparo e carinho em todos os momentos. Serei eternamente grata.

Ao meu noivo, *Andre Baptista Alves*, por toda paciência, amor, carinho e por ser meu porto seguro, quando por muitas vezes o caminho parecia ser impossível de ser percorrido.

A minha sobrinha *Maria Eduarda da Costa Guirado*, meu "pedacinho do céu", que me ensinou que às vezes o medo e o desespero encontram paz em um simples: "Titia eu te amo". O presente trabalho foi realizado com o apoio da *Fundação de Amparo à Pesquisa* do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2014/17029-4 e da *Coordenação* de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador *Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.*, por toda confiança depositada em mim para realização deste trabalho. Não foi um caminho fácil, mas finalizo essa etapa, com a certeza do meu amadurecimento profissional e pessoal. E certa de que: "Só se perde uma luta, depois que estamos mortos. Insista e persista sempre!".

Ao Dr. *Andrés Jimenez Galisteo Jr.*, pela amizade, confiança no meu trabalho e toda disponibilidade em compartilhar seu conhecimento para o aprimoramento e concretização deste trabalho.

Ao *Luciano Monteiro da Silva*, por nos salvar de todos os "perrengues" relacionados a reagentes ou a parte administrativa dos projetos. Obrigada pela paciência, esforço e dedicação sem nunca medir esforços para ajudar a todos no laboratório.

À **Sonia Aparecida dos Anjos Ferraz**, por toda atenção, carinho e amparo, e por sempre nos oferecer melhores condições de trabalho no laboratório.

À *Nahiara Esteves Zorgi,* por todo apoio, carinho, amizade e companheirismo em todos os momentos, bons e ruins.

Aos amigos que a pós-graduação me trouxe: *Jaqueline Polizeli Rodrigues*, *Camila Aparecida de Carvalho*, *Gisele Pacifico Sartori*, *Luiz Henrique da Silva Nali, Thiago Fidelis Ferrão* e *Alex M. Nasare*, obrigada pela amizade, apoio e companheirismo, durante minha trajetória neste projeto. Obrigada pelas conversas e momentos de descontração.

À *Laura Massami Sumita*, nossa "mãe oriental", vulgo "Mestre dos Magos", por sempre se mostrar disposta a ajudar. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade e por cada bombom deixado em nossas mesas.

À *Roselaine Pereira Alvin Cardoso*, por todos os ensinamentos técnicos, pelo auxilio na produção de antígenos e pelos bons momentos de descontração.
Aos meus pais, *José Amadeus* e *Josimeire*, por todo suporte, educação, torcida e incentivo em todos os momentos.

À *Geni Baptista Alves*, *Janaína Baptista Alves* e *Lissandra Baptista Alves*, por todo carinho, torcia e incentivo.

Aos professores, *Beatriz* Simonsen *Stolf Carboni*, *Roberto Mitsuyoshi Hiramoto* e *Fabiana Martins de Paula*, pelas valiosas sugestões no exame de Qualificação.

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia: *Aline Bastos dos Passos, Beatriz Möller, Barbara Fialho, Bruna Macedo, Cayuan Tadeu Brandão, Cynara Marques de Almeida, Dennis Fujita, Elizama Carneiro Machado Bezerra, Fernanda Siqueira Cavalcante, Flávia Freitas, Joana Gabriele Desiderato, Juliana Mecca, Marina Demicheli, Larissa Festa, Nathaly Montagnana de Menezes, Raíssa Char Forgoso, Renan Tripode Batarquine, Talita Caroline Coelho dos Santos, Tamires Chorense Nunes, Vanessa Rodrigues da Silva, Dr. Norival Kesper Jr., Marilda Savoia, Sandra Regina Castro Soares.*

À **Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman**, pelo auxílio em relação as normas de uso de animais de laboratório, as sugestões para a realização deste trabalho e aos momentos de descontração.

Ao instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), principalmente aos engenheiros, *Elizabeth S. R. Somessari* e *Carlos G. da Silveira*.

Ao laboratório de *Investigações Médicas-49 do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM49-HCFMUSP)*, pelo suporte técnico, na compra de materiais, equipamentos e reagentes necessários para realização deste projeto.

Ao Biotério de experimentação animal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelos cuidados e manutenção dos animais experimentais.

Ao Biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxilio na manutenção e expansão dos animais geneticamente modificados, utilizados neste projeto.

À Dra. *Maria Anita Mendes*, do Grupo Dempster, pelo auxílio na caracterização das amostras por MALDI-TOF.

A todos os camundongos, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Aos amigos, *Andreia Suemi Uehara, Fabiana Moraes Boselli, Elton Dias, Thiago Emidio Teixeira*, pela amizade e os bons momentos de descontração.

Aos amigos de Tocantins, *Gabriela Ortega Coelho Tomazi*, *Andre Rocha*, *Thompsom Turíbio* e *Raquel Da Silva Aires*.

À pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP).

À secretária da pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, *Eliane Araújo*, por todo suporte prestado.

In memoriam

Aos meus avós maternos e padrinhos, *Maria da Graça da Costa* e *Germinio Manoel da Costa*, aos meus avós paternos, *José Manoel da Costa* e *Maria Lima da Costa* e a *Nanci do Nascimento*.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho.

"Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa de se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entrar no oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de tornar-se oceano."

(Osho)

RESUMO

da Costa A. Mecanismo de reconhecimento e processamento imune de antígenos aprimorados por radiação gama na toxoplasmose (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019.

A toxoplasmose, causadas por protozoário Apicomplexa, Toxoplasma gondii, é amplamente disseminada e pouco sintomática. A infecção crônica mantém cistos residuais por toda a vida, mas protege da reinfeccão. Neste cenário complexo, vacinas com cistos residuais não são factíveis e vacinas de subcomponentes resultam em baixa proteção. A radiação ionizante foi usada para aprimoramento de imunógenos tanto vivos ou de subcomponentes. O uso da radiação gama em extratos solúveis de taquizoítos de T. gondii foi eficiente na proteção de camundongos contra a infecção utilizando diferentes cepas, sem adjuvantes e de fácil conservação. O antígeno irradiado passa por alterações físicas sem adição de novas moléculas, com agregação de proteínas, quebras de cadeias e reações oxidativas, que podem melhorar seu direcionamento a receptores celulares em células apresentadoras de antígeno (APC). Os extratos irradiados apresentaram alterações estruturais mínimas afetando 60% das proteínas, mas com manutenção das características antigênicas e imunogênicas. O extrato irradiado a 1500Gy (STag 1500Gy) induziu maior proteção e maior resposta humoral que o extrato nativo (p<0.05), mais evidente na dose de 10µg/animal, com altos índices de anticorpos IgG específicos e maior maturação da afinidade de IgG específica, com eficiência similar ou inferior em doses maiores. Animais imunizados com STag 1500Gy apresentaram maiores proporções de linfócitos B e T CD4⁺ de memória, enquanto que a imunização com taquizoítos íntegros irradiados mostrou aumento de linfócitos T CD8⁺, ambas muito maiores que a induzida por STag nativo. Construímos STag marcados por via biossintética ou por acoplamento a diferentes marcadores não-oxidativos. STag³H 1500Gy apresentou captação maior e mais duradoura por macrófagos, sem degradação como STag³H nativo. O uso de STags fluorescentes, mostrou que a maior ligação do STag 1500Gy não é relacionada a susceptibilidade a proteases, dada a mesma sensibilidade dos extratos para as peptidases testadas, além de permanecer na célula por muito mais tempo. Na presença de bloqueadores de receptores Scavengers Dextran sulfato (SRA) e Probucol (CD36), a ligação e captação por macrófagos do STag 1500Gy foi mais afetada por inibidores de radicais oxidados (CD36) do que por inibidores de radicais negativos (SRA). Em macrófagos peritoneais de camundongos deficientes do receptor Scavenger CD36 (KOCD36^{-/-}), observamos uma cinética inversa a que foi obtida em macrófagos normais, com menor incorporação do STag 1500Gy, fato comprovado tanto por ensaios quantitativos como por ensaios em células individuais por citometria de fluxo. Os animais KOCD36^{-/-} não mostram produção significativa de IgG específica em todos os imunógenos usados, e foram altamente suscetíveis ao desafio com cepas viáveis de T. gondii agressivas ou cistogênicas. O transplante de macrófagos peritoneais normais "primados" com STag 1500Gy em animais KOCD36^{-/-} mostrou aumento de IgG específica em soro de animais recipientes. A melhor imunogenicidade dos antígenos irradiados deve ser relacionada a captação de proteínas oxidadas via CD36, que dirige estes antígenos para via intracelular favorável à sua apresentação para resposta imune adaptativa. Nossos resultados mostram que a radiação ionizante foi capaz de modificar proteínas dos STag tornando seu processamento por células imunes mais eficiente, sem a adição de adjuvantes ao processo.

Descritores: *Toxoplasma gondii*. Vacinas. Antígenos. Receptores de Antígenos. Radiação ionizante. Proteínas

ABSTRACT

da Costa A. Mechanism of recognition and immune processing of antigens enhanced by radiation gamma in toxoplasmosis (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019

Toxoplasmosis, caused by the protozoan Apicomplexa, Toxoplasma gondii, is widely disseminated and little symptomatic. Chronic infection maintains residual cysts throughout life, but protects from reinfection. In this complex scenario, vaccines with residual cysts are not feasible and vaccines of subcomponents result in low protection. lonizing radiation was used for enhancement of either live or subcomponent immunogens. The use of gamma radiation in soluble extracts of T. gondii tachyzoites was efficient in protecting mice against infection using different strains, without adjuvants and easy management. The irradiated antigen undergoes physical changes without addition of new molecules, with protein aggregation, chain breaks and oxidative reactions, which can improve its targeting to cellular receptors in antigen-presenting cells (APCs). The irradiated extracts showed minimal structural alterations affecting 60% of the proteins, but with maintenance of the antigenic and immunogenic characteristics. The extracts irradiated at 1500Gy (STag 1500Gy) induced greater protection and higher humoral response than the native extract (p < 0.05), more evident at a dose of 10µg/animal, with high specific IgG antibody levels and increased maturation of specific IgG affinity, with similar or lower efficiency at higher doses. Animals immunized with STag 1500Gy presented higher proportions of memory lymphocytes B and CD4⁺ while immunization with irradiated intact tachyzoites showed an increase in CD8⁺ lymphocytes, both much larger than that induced by native STag. We construct STag labeled by biosynthetic pathway or by coupling to different non-oxidative markers. STag^{3H} 1500Gy showed greater and longer uptake by macrophages, with no degradation as STag^{3H} native. The use of fluorescent STags showed that the greater binding of the STag 1500Gy is not related to the loss of protease susceptibility, given the same sensitivity of the extracts for peptidases, besides remaining in the cell for much longer time by fluorescence. In the presence of Scavengers receptor blockers Dextran sulfate (SRA) and Probucol (CD36). binding and uptake of STag 1500Gy in macrophages was more affected by oxidized radical (CD36) inhibitors than by negative radical inhibitors (SRA). In peritoneal macrophages of Scavenger receptor CD36 deficient mice (KOCD36^{-/-}), we observed an inverse kinetics, with less incorporation of STag 1500Gy, as evidenced by both quantitative assays and individual cells by cytometry flow, compared to wild type macrophages. KOCD36^{-/-} animals did not show significant production of specific IgG in all immunogens used, and were highly susceptible to challenge with viable strains of aggressive or cistogenic T. gondii strains. Transplantation of normal peritoneal macrophages "primed" with STag 1500Gy induced increase of specific IgG in sera from CD36^{-/-}recipient animals. The best immunogenicity of the irradiated antigens should be related to the uptake of oxidized proteins via CD36 in APCs, which directs these antigens to the intracellular route favorable to their presentation for adaptive immune response. Our results show that ionizing radiation was able to modify STag proteins, making its processing by immune cells more efficient without the addition of adjuvants to the process.

Key words: *Toxoplasma gondii*. Vaccines. Antigens. Antigens receptors. Ionizant radiation. Proteins.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 07 de Maio de 2014

llmo(a) Dr(a). Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior (aos cuidados de Andrea 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 da Universidade 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/000274A 'Mecanismo de reconhecimento e processamento imune de imunógenos aprimorados por radiação gama na toxoplasmose. ', sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Ocna"

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

⁶⁰ CO	Cobalto-60				
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (Acquired immunodeficiency				
	syndrome)				
APC	Células Apresentadoras de Antígeno				
BSA	Albumia de soro bovino				
DAB	3,3'-diaminobenzidina				
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo				
e ⁻ aq	Elétron Aquoso				
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético				
ELISA	Ensaio imuno-enzimático de fase sólida (Enzyme Linked				
	Immunoassorbent Assay)				
FITC	Isotiocianato de fluoresceína				
GRA	Proteínas dos Grânulos densos (Dense Granule Proteins)				
Gy	Gray				
H ₂ 0 ₂	Peróxido de Hidrogênio				
(H ₂)	Hidrogênio Molecular				
H0 ₂ •	Peroxila				
HCI	Ácido clorídrico				
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (Human immunodeficiency vírus)				
lgA	Imunoglobulina A				
lgG	Imunoglobulina G				
lgM	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				
kDa	Kilodalton				
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível				
mg	Miligrama				
mL	Mililitro				

MM	Massa Molar
MØ	Macrófagos
МНС	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIC	Proteínas dos Micronemas (Microneme Proteins)
NaN₃	Azida sódica
NaCl	Cloreto de Sódio
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nitrico
O ²	Oxigênio
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
RON	Proteínas do pescoço da roptria (Ropthry Neck Proteins)
ROP	Proteínas das roptrias (Ropthry Proteins)
SAG	Antígeno principal de superfície (Surface antigen)
SFB	Soro fetal bovino
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
STag	Antígeno solúvel de Taquizoítos de T. gondii
STag _₿	Antígeno solúvel de Taquizoítos de T. gondii marcados com biotina
STag _F	Antígeno solúvel de Taquizoítos de T. gondii marcados com isotiocianato
	de fluoresceína
STag₃ _H	Antígeno solúvel de Taquizoítos de T. gondii marcado com L-[2,3,4,5-
	3H]-Prolina
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
pg	Picograma
mg	Miligrama
RS	Receptor Scavenger

LISTA DE FIGURAS

Figura	1	Estágios infecciosos de <i>T. gondii</i> . A- Taquizoítos no interior de macrófagos peritoneais; B- Bradizoítos; C- Cistos tecidual, contendo centenas de bradizoítos; D- Oocisto não esporulado; E- Oocisto não esporulado, indicando dois esporocistos (cabeça das das setas) e um esporozoítos (setas menores). Figura adaptada ²	31
Figura	2	Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> . Biologia, infecção e replicação dos estágios infectantes do parasito em seus hospedeiros. Figura adaptada ¹¹	33
Figura	3	Imunidade na toxoplasmose. Esquema demonstrando a invasão de taquizoítos na célula hospedeira e as respostas imunes, inata e adaptativa, na infecção por <i>T. gondii</i>	38
Figura	4	Representação dos membros da família de receptores Scavenger, indicando seus domínios. Figura adaptada ¹²²	49
Figura	5	Esquema (A) das diferentes vias intracelulares e (B) os principais revestimentos de vesículas endocíticas	51
Figura	6	Estratégia de análise de linfócitos T e B no sangue periférico de camundongos imunizados com STag nativo ou irradiado e taquizoítos de <i>T. gondii</i> irradiados à 255Gy, por via subcutânea. Analise realizada no software FlowJo V10	69
Figura	7	<i>Western blot</i> mostrando o acoplamento covalente de biotina aos STag. 1- STag nativo; 2- STag 250Gy; 3- STag 500Gy, 4- STag 1000Gy; 5- STag 1500Gy. Revelação pela adição de avidina conjugada a peroxidase (1:5.000) e substrato cromógeno TMB.	72
Figura	8	Estratégia de análise de população de macrófagos peritoneais que incorporados com STag _F nativo ou irradiados. Análise realizada pelo <i>Flowing software</i>	84
Figura	9	EGPA (12,5%) dos STag nativo e irradiados a diferentes doses de radiação-γ por fonte de Co-60. A- Lane 1- STag nativo; Lane 2- STag 250Gy; Lane 3- STag 500Gy; Lane 4- Stag 1000Gy. Lane 5- STag 1500Gy. B- STag nativo	88
Figura	10	Densitometria da área de corrida das amostras de STag nativo e irradiados detectadas no EGPA por software	

		ImageJ. A- STag nativo x STag 250Gy; B- STag nativo x STag 500Gy; C- STag nativo x STag 1000; D- STag nativo x STag 1500Gy. STag nativo (verde); STag irradiados (magenta)	89
Figura	11	Espectrometria de massa (MALDI-TOF) das proteínas dos STag: A- nativo; B- STag 250Gy; C- STag 1500Gy	92
Figura	12	Perfil do reconhecimento de anticorpos IgG específicos presentes no soro de camundongos infectado pela cepa ME-49 de <i>T. gondii</i> (Diluição 1:100) às proteínas de STag nativo e irradiado por <i>Western blot.</i> A. 1. STag nativo; 2. STag 250Gy; 3. STag 500Gy; 4. Stag 1000 Gy. 5. STag 1500Gy. B. Lane STag nativo, setas indicam proteínas estruturais preservadas.	95
Figura	13	Microscopia ótica de fluorescência indicando a localização dos STag _{F:} A- nativo; B- 250Gy; C- 1500Gy em culturas macrofágicas da linhagem J774 por diferentes períodos de incubação (0, 15, 30 e 60 minutos). Verde = STag nativo e irradiados conjugados ao FITC; azul = marcação do núcleo celular pelo corante Hoechst. Aumento de 40x	129
Figura	14	Histologia de baço de camundongo knockout C57Bl/6jCD36 ^{-/-} ; Aumento de 20x. (Coloração por Hematoxilina e Eosina)	142
Figura	15	Histologia de timo de camundongo knockout C57Bl/6jCD36 ^{-/-} ; A e B- Aumento de 20x; C- Aumento de 40x (Coloração por Hematoxilina e Eosina)	142
Figura	16	Histologia de fígado de camundongo knockout C57Bl/6jCD36 ^{-/-} . Aumento de 40x. (Coloração por Hematoxilina e Eosina)	144
Figura	17	Gel de agarose das proteínas do soro de animais WTCD36 ^{+/+} (lanes1-4) e KOCD36 ^{-/-} (Lanes 5-8)	145
Figura	18	Detecção da proteína correspondente ao receptor <i>Scavenger</i> CD36 em MØCD36 ^{+/+} e MØCD36 ^{-/-} por <i>Western blot.</i> 1-2 MØCD36 ^{+/+} tratado com tampão de amostra com e sem uréia. 3-4 Lisado de MØCD36 ^{+/+} tratado com tampão de amostra com e sem uréia. Seta indica proteína correspondente ao receptor.	147

- Figura 20 Esquema de processamento intracelular de antígenos hidrossolúveis em relação ao tipo de receptor celular utilizado em sua captação pelo sistema de vesículas de APCs. A- Antígenos nativos e solúveis; B- Antígenos oxidados ou irradiados; C- Antígenos oxidados ou irradiados.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Otimização da concentração de STag nativo e irradiados a 250 Gy, 500 Gy, 1000 Gy e 1500 Gy conjugados a biotina e revelados pela adição de avidina conjugada a peroxidase (1:10.000). A- Curva analítica ajustada usando o modelo de regressão linear. R²=STag nativo (0.990), STag 250Gy (0.991), STag 500Gy (0.982), STag 1000Gy (0.977) e STag 1500Gy (0.992). B- Crescimento exponencial da curva mostrando a atividade específica das amostras e a taxa de marcação de biotina em cada produto....
- Gráfico 2 Cromatografia de exclusão molecular de amostras de STag conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) em coluna Sephadex G-25-40, sob o fluxo de 0.5 mL por minuto e frações de 0.5 mL. A. STag_F nativo. B. STag_F 250Gy. C. STag_F 1500Gy. Taxa média molar da quantidade de fluorocromo por proteínas (F/P) = 2.74 mols de FITC por mol 75 de proteína......

- Gráfico 5 Comparação da produção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii no* soro de camundongos Balb/c imunizados por via subcutânea com três doses quinzenais de STag nativo ou STag irradiado a 250Gy, 500Gy e 1500Gy, detectados por ELISA. Linha tracejada representa a produção basal de IgG. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (**, *** = p<0.05)....</p>
- Gráfico 6 Comparação da porcentagem (%) de avidez de anticorpos lgG no soro de camundongos Balb/c imunizados por via subcutânea com 3 dosese STag nativo ou STag irradiados a 250Gy, 500Gy e 1500Gy detectados por ELISA. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos

72

- Gráfico 18 Ensaio de ligação dos STag_B nativo ou irradiados em macrófagos linhagem J774 (2x10⁶ células/poço) na ausência ou presença de bloqueadores de receptores Scavenger (0.04

 μ g/100 μ I). **A**- STag_B nativo + Dextran sulfato ou Probucol; **B**-STag_B 250Gy + Dextran sulfato ou Probucol; **C**- STag_B 1500Gy + Dextran sulfato ou Probucol; Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam diferença significativa na presença ou ausência dos bloqueadores (**=p<0.05; ****=p<0.0001).....

- Gráfico 21 Comparação das concentrações de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM detectadas no soro de animais wild type C57BI/6j (WTCD36^{+/+}) e knockouts C57BI/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}) por ELISA direto. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa (***=p<0.05; ****=p<0.0001) entre os grupos analisados....... 145
- Gráfico 22 Reconhecimento de anti-CD36 conjugado a biotina a proteínas presentes em lisado de macrófagos CD36^{+/+} e macrófagos CD36^{-/-}. Ensaio realizado em triplicatas e revelados pela adição de avidina conjugada a peroxidase (1:10.000). Barras representam o desvio padrão da média..... 148

- Gráfico 24 Diferenca na incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a STag^{3H} 250Gy STag^{3H} 1500Gy (1µg/poço) em macrófagos peritoneais A-MØCD36^{+/+} ou B- MØCD36^{-/-} em diferentes períodos de exposição (0, 0.5, 1.0, 2.0 e 4 horas). Dados apresentados por contagem de radioatividade (cpm) 152
- Gráfico 25 Porcentagem de incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a STag^{3H} 250Gy STag^{3H} 1500Gy (1µg/poço) em macrófagos peritoneais A- MØCD36^{+/+} ou B- MØCD36^{-/-} em diferentes períodos de exposição (0, 0.5, 1.0, 2.0 e 4 horas) 154
- Gráfico 26 Porcentagem de incorporação de STag nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy conjugados ao FITC em macrófagos peritoneais obtido de camundongos: A- C57BI/6jCD36+/+ (MØWTCD36^{+/+}; CD68^{High} CD36^{+High}); **B-** C57BI/6jCD36^{-/-} (MØWTCD36^{-/-}; CD68^{High} CD36^{Neg}) 157
- Gráfico 27 Comparação da produção de anticorpos IgG específicos antigondii ou anti-BSA no soro de camundongos Т C57BI/6jCD36^{+/+}(WTCD36^{+/+}) e C57BI/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}) imunizados com três doses quinzenais por via subcutânea com STag nativo ou STag irradiados a 250Gy e 1500Gy e BSA nativa, detectados por ELISA. Linha tracejada representa a produção basal de IgG. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (*=p<0.01; **, ***=p<0.05; ****=p<0.0001) 159
- Gráfico 28 Comparação da porcentagem da avidez de anticorpos IgG específicos em camundongos WTCD36^{+/+} e KOCD36^{-/-}, imunizados por via subcutânea com STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy ou BSA nativa detectados por ELISA. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos imunizados (**= p<0.05, *** = p<0.01, **** = p<0.001) 160
- Gráfico 29 Porcentagem (%) da sobrevida de camundongos. A-C57BI/6jWtCD36^{+/+} e B- C57BI/6jKoCD36^{-/-} imunizados com STag nativo ou STag 250 Gy e STag 1500 Gy e desafiados com 10³ taquizoítos viáveis da cepa RH virulenta 30 dias após a última dose de imunização. Asteriscos representam a diferença entre as curvas de sobrevivência entre grupo controle e imunizado pelo teste Log-Rank..... 163
- 30 Proporção (%) de linfócitos T, A- totais; B- CD3⁺CD4⁺; C-Gráfico CD3⁺CD8⁺ e D- células B (CD19⁺) obtidos no sangue periférico de camundongos knockouts C57BI/6jCD36-/-,

imunizados com STag nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy de Co-60. Asteriscos representam diferença estatística entre os grupos (*=p<0.01; **, ***=p<0.05; ****=p<0.0001) 166

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	Peptidases e tampões de ação	76
Tabela	2	Características e atividade especifica dos diferentes métodos de marcação dos STags utilizados posteriormente em ensaios de captação e cinética em macrófagos	115
Tabela	3	Intensidade sugerida para cada um dos processos	178

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	Toxoplasma gondii	29
1.2	Ciclo de vida	32
1.2.1	Aspectos Epidemiológicos da Toxoplasmose	33
1.2.1.1	Toxoplasmose em humanos	33
1.2.1.2	Toxoplasmose em animais	35
1.3	Imunidade na Toxoplasmose	36
1.4	Vacinas para Toxoplasmose	38
1.5	Radiação Ionizante	40
1.6	Vacinas e radiação ionizante	41
1.7	Adjuvantes	43
1.8	Vacinas	45
1.9	Receptores Scavenger	47
2	JUSTIFICATIVA	53
3	OBJETIVOS	56
3.1	Gerais	56
3.2	Específicos	56
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	Parasitos	57
4.1.1	Cepa RH virulenta (ATCC n° 50174)	57
4.1.2	Cepa ME-49 cistogênica (ATCC n° 50611)	57
4.2	Animais experimentais	58
4.3	Obtenção de antígeno solúvel de taquizoítos de Toxoplasma gondii	
	para ensaios imunoenzimáticos e de imunização (STag)	58
4.4	Irradiação das amostras	59
4.5	Caracterização das amostras de STag nativo ou irradiados	59
4.5.1	Eletroforese - EGPA-SDS	59
4.5.2	Densitometria	60
4.5.3	Western blot	61
4.5.4	MALDI-TOF	61
4.6	Avaliação da resposta imune humoral de camundongos imunizados	62

4.6.1	Imunização dos animais	62
4.6.2	Avaliação quantitativa da eficiência na resposta humoral induzida pela	
	imunização de camundongos Bab/c com STag nativo ou irradiados a	
	250Gy e 1500Gy e a diferença entre a resposta imune humoral induzida	
	com a imunização por STag ou taquizoítos da cepa RH irradiados a	
	255Gy	63
4.6.3	C57BI/6j (WTC57) e C57Bi/6jCD36 ^{-/-} (KOCD36 ^{-/-})	63
4.6.4	Imunização utilizando Albumina de soro bovino (BSA)	63
4.6.5	Imunização de camundongos C57Bi/6jCD36 ^{-,} com macrófagos	
	peritoneais transplantados de camundongo C57Bi/6jCD36 ^{+/+}	
	"primados" com STag nativo ou irradiado a 1500Gy	64
4.7	Obtenção de amostras do soro de animais imunizados	64
4.8	Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos específicos	
	(ELISA)	65
4.8.1	Porcentagem da avidez de anticorpos IgG	66
4.9	Avaliação da resposta imune protetora de animais imunizados-Desafio	
	de camundongos imunizados por via subcutânea com STag nativo ou	
	irradiados a 250Gy e 1500Gy por taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa RH,	
	(tipo I) virulenta ou cepa ME-49, cistogênica (tipo II)	66
4.9.1	Cepa RH	66
4.9.2	Сера МЕ-49	67
4.10	Avaliação da resposta imune celular de animais imunizados	67
4.10.1	Marcação da superfície celular do sangue periférico de camundongos	
	imunizados	67
4.10.2	Estratégia de análise para determinar as populações celulares do	
	sangue periférico de camundongos imunizados com STag nativo, STag	
	250Gy, STag 1500Gy e taquizoítos da cepa RH, irradiados à 255Gy por	
	fonte de Co-60	68
4.11	Linhagens celulares para obtenção de taquizoítos de T. gondii	
	incorporados com prolina-3H tritiada, ou ensaios ligação e captação	
	dos STag nativo ou irradiados	69
4.11.1	Cultura de células da linhagem Vero	69
4.11.2	Macrófagos J774	70
4.11.3	Macrófagos Peritoneais	70
4.12	Obtenção de antígenos solúveis (STags) marcados de forma não-	
	oxidativa para ensaios de ligação e captação em macrófagos	71

4.12.1	Biotinilação de STag nativo ou irradiado para ensaios de ligação	
	(STag _B)	71
4.12.2	Marcação biossintética de taquizoítos de <i>T. gondii</i> por incorporação de	
	prolina tritiada para obtenção de STag 3-H (STag ^{3H})	73
4.12.2.1	Infecção das culturas Vero por taquizoítos de cepa RH de <i>T. gondii</i>	73
4.12.3	Marcação das amostras de STag, nativo ou irradiados a 250Gy e	
	1500Gy com fluoresceína isotiocianato (FITC-STag _F)	74
4.12.3.1	Cálculo da razão molar fluoresceína x proteína (F/P)	75
4.13	Ação das peptidases, tripsina, papaína e pepsina sobre os $STag_F$ nativo	
	e irradiados a 250Gy e 1500Gy	76
4.14	Ensaios de ligação e captação dos STag nativo ou irradiado em	
	macrófagos	77
4.14.1	Ensaios da cinética da ligação dos STag nativo ou irradiado em	
	macrófagos a partir do modelo biotina-avidina (STag_B)	77
4.14.2	Ensaio de ligação e cinética dos STag⊧ nativo ou irradiados a 250Gy e	
	1500Gy em macrófagos J774, por microscopia óptica de	
	fluorescência	78
4.15	Interferência dos bloqueadores de receptores Scavenger, dextran	
	sulfato ou probucol na ligação dos STag _B nativo ou irradiado em	
	macrófagos	79
4.16	Caracterizações imunes e estruturais do receptor Scavenger CD36	
	presentes em macrófagos peritoneais de camundongos knockouts	
	C57BI/6jCD36 ^{-/-} (KOCD36 ^{-/-})	80
4.16.1	Histologia	80
4.16.2	Detecção da proteína correspondente ao receptor Scavenger CD36 em	
	lisados de macrófagos peritoneais de camundongos WTCD36+/+ou	
	KOCD36 ^{-/-}	80
4.16.2.1	Western blot	80
4.16.3	Reação em fase sólida para detecção da proteína correspondente ao	
	receptor Scavenger CD36 em lisados de macrófagos peritoneais	81
4.17	Ensaio de ligação dos STag ^{3H} nativo ou irradiado em macrófagos	
	peritoneais de camundongos wild type C57BI/6j ou de camundongos	
	knockouts C57BI/6jCD36 ^{-/-}	81
4.17.1	Reconhecimento inicial a frio	81
4.17.2	Ligação específica	82

4.18	Ensaio de incorporação de STag _F nativo e irradiado a 250 e 1500Gy	00
	em macrofagos CD36 ^{1/1} e CD36 ^{1/1} por citometria de fluxo	82
4.18.1	Tratamento e obtenção de macrofagos peritoneais CD36 ¹⁷¹ e CD36 ¹⁷¹	
	para ensaios de citometria	82
4.18.2	Marcação celular	83
4.18.3	Estratégia de análise para determinar as populações de macrófagos	
	peritoneais que incorporaram STag⊧ nativo ou irradiados a 250Gy e	
	1500Gy	84
4.19	Análise Estatística	85
5	RESULTADOS DISCUTIDOS	86
5.1	Avaliação dos efeitos estruturais, antigênicos e imunogênicos	
	induzidos em antígenos solúveis de taquizoítos de T. gondii (STag)	
	irradiados com radiação gama por fonte homogênea de Co-60	86
5.1.2	Efeitos estruturais induzidos em antígenos solúveis de taquizoítos de	
	T. gondii (STag) irradiados a 250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy por	
	fonte homogênea de Cobalto-60 (Co-60)	87
5.1.3	EGPA (Eletroforese em gel de Poliacrilamida)	87
5.1.4	Densitometria das bandas dos STag nativo e irradiados a 250Gy,	
	500Gy, 1000Gy e 1500Gy	88
5.1.5	MALDI-TOF - Espectrometria de massa dos STag nativo ou irradiados	
	a 250Gy e 1500Gy	91
5.1.6	Efeitos antigênicos e imunogênicos induzidos em antígenos	
	solúveis de taquizoítos de T. gondii (STag) irradiados a 250Gy,	
	500Gy, 1000Gy e 1500Gy por fonte homogênea de Cobalto-60 (Co-	
	60)	94
5.1.7	Western Blot - Avaliação da antigenicidade	94
5.1.8	ELISA – Avaliação da imunogenicidade	94
5.2	Definição da massa de proteína efetiva para ensaios de imunização e	
	comparação da resposta imune humoral, celular e protetora induzida	
	por STag nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy comparados a	
	taquizoítos íntegros de <i>T. gondii</i> irradiados a 255Gy (RH 255Gy)	99
5.2.1	Avaliação quantitativa da eficiência na resposta humoral induzida pela	
	imunização de camundongos Balb/c com STag nativo e irradiado a	
	250Gy e 1500Gy comparados a taquizoítos íntegros da cepa RH de <i>T</i> .	
	gondii irradiados a 255Gy	100

5.2.2	Proteção induzida em camundongos Balb/c imunizados com diferentes	
	massas de STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e RH 255Gy e	
	desafiados com 10 ³ taquizoítos viáveis da cepa RH virulenta de T.	
	gondii	105
5.2.3	Perfil da resposta imune celular induzida após a imunização de	
	camundongos Balb/c com STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e	
	taquizoítos íntegros da cepa RH de <i>T. gondii irradiados</i> a 255Gy	108
5.3	Demonstração da cinética de ligação e processamento dos STag nativo	
	ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em linhagem macrofágica J774 e	
	avaliação da ação de inibidores de receptores específicos	114
5.3.1	Avaliação da diferença na ligação de STag biosinteticamente marcados	
	com 3H-prolina (STag ^{3H} nativo e irradiados a STag ^{3H} 250Gy e STag ^{3H}	
	1500Gy) em cultura macrofágicas da linhagem J774 (MØJ774)	116
5.3.2	Capacidade inibitória do bloqueador de Scavenger, Dextran sulfato e	
	Probucol na ligação dos STag ^{3H} nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy	
	em culturas macrofágicas da linhagem J774	119
5.3.3	Diferença na ligação dos STag nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy	
	acoplados a biotina (STag _B) em culturas macrofágicas da linhagem	
	J774	123
5.3.4	Localização dos STag⊧ nativo e irradiados em culturas macrofágicas da	
	linhagem J774 (MØJ774) por microscopia óptica em diferentes	
	períodos de tempo (0, 15, 30 e 60 minutos)	127
5.3.5	Capacidade inibitória de bloqueadores de Scavengers Dextran sulfato	
	e Probucol na ligação dos STag _B nativo ou irradiados a 250Gy e	
	1500Gy em culturas macrofágicas da linhagem J774	130
5.3.6	Susceptibilidade dos STag _F nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy à	
	ação das peptidases, tripsina, papaína e pepsina	136
5.4	Avaliação da participação do receptor Scavenger CD36 no	
	processamento de STag irradiados e imunogenicidade em	
	camundongos wild type C57BI/6j (WTCD36+/+) e knockouts C57BI/6j	
	CD36 ^{-/-} (KOCD36 ^{-/-})	140
5.4.1	Análise histológica de baço, timo e fígado de camundongos	
	C57BI/6jCD36 ^{-/-}	141
5.4.2	Comparação da quantidade de imunoglobulinas séricas (IgG, IgA e	
	IgM) em camundongos wild type C57Bl/6j (WTCD36+/+) e knockouts	
	C57BI/6jCd36 ^{-/-} (KOCD36 ^{-/-}) por ELISA direto	144

5.4.3	Western blot	147
5.4.4	Diferença na ligação de STag biossinteticamente marcados com prolina	
	em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos wild type	
	$C57BI/6iCD36^{+/+}$ (MØCD36^{+/+}) ou knockouts $C57BI/6iCD36^{-/-}$	
	(MØCD36 ^{-/-})	148
5.4.4.1	Reconhecimento inespecífico (Ensaio de ligação à frio)	148
545	Cinética da captação e internalização de STaq ^{3H} nativo ou irradiados a	
	250Gv e 1500Gv por macrófagos peritoneais de camundongos	
	KOCD36 ^{-/-} ou WTCD36 ^{+/+}	150
5.4.6	Deteccão da incorporação de STaq⊧ nativo ou irradiados a 250Gv e	
	1500Gv por citometria de fluxo em macrófagos de camundongos	
	WTCD36 ^{+/+} ou KOCD36 ^{-/-}	155
5.4.7	Resposta imune humoral induzida em camundongos C57BI/6j	
	(WTCD36 ^{+/+}) e camundongos <i>knockouts</i> C57BI/6jCD36 ^{-/-} (KOCD36 ^{-/-}),	
	imunizados por via subcutânea com STag nativo ou irradiado a 250Gy	
	e 1500Gy por fonte homogênea de Co-60	158
5.4.8	Desafio de camundongos C57BI/6jCD36 ^{+/+} e C57BI/6jCD36 ^{-/-}	
	imunizados com STag nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy de Co-60,	
	com cepa RH (Tipo I) virulenta e cepa cistogênica M-49 (Tipo II) de <i>T.</i>	
	gondii	162
5.4.8.1	Cepa RH	162
5.4.8.2	Сера МЕ-49	163
5.4.9	Perfil celular observado em linfócitos do sangue periférico de	
	camundongos knockouts C57Bl/6jCD36-/-, imunizados por via	
	subcutânea com STag nativo ou irradiado a 250Gy e 1500Gy	165
5.4.10	Avaliação da resposta imune humoral induzida em animais KOCD36-/-	
	transplantados com macrófagos peritoneais de animais WTCD36*/+	
	"primados" com STag nativo ou irradiado a 1500Gy	169
6	DISCUSSÃO GERAL	172
7	CONCLUSÕES	182
7.1	Gerais	182
7.2	Específicas	182
	REFERÊNCIAS	184

1 INTRODUÇÃO

1.1 Toxoplasmose e Toxoplasma gondii.

O parasito *Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez em 1908, por Nicolle e Manceaux, em tecidos dos órgãos do roedor, *Ctenodactylus gundi*, utilizado na pesquisa de leishmaniose no laboratório Charles Nicolle, no Instituto Pasteur na Tunísia. No Brasil, o parasito foi descrito por Splendore nos tecidos dos órgãos de um coelho¹. O *T. gondii* apresenta uma vasta variedade de hospedeiros intermediários, tais como aves e mamíferos, incluindo o homem, e tem como hospedeiro definitivo os felídeos ². A toxoplasmose pode ser adquirida pela ingestão de alimentos contaminados por oocistos esporulados, que são eliminados junto as fezes dos felinos, ou de carnes malcozidas contendo cistos teciduais³. Embora seja uma infecção benigna em pacientes imunocompetentes, em indivíduos imunodeprimidos, como portadores de HIV ou transplantados, a toxoplasmose pode causar graves complicações⁴. A infecção aguda materna durante a gravidez pode atingir o feto (infecção congênita) podendo levar a cegueira, aborto, retardo mental, hidrocefalia ou até mesmo a morte fetal⁵.

O *T. gondii* apresenta três estágios infecciosos: taquizoítos (Figura 1A), de rápida divisão; bradizoítos (Figura 1B) de divisão mais lenta no interior de cistos teciduais (Figura 1C); e um estágio ambiental, os esporozoítos, no interior de oocistos (Figura 1E). Taquizoítos (Figura 1A), são a forma de disseminação e são capazes de invadir qualquer célula nucleada de vertebrados, se multiplicando em um vacúolo parasitóforo². Os bradizoítos (Figura 1B), resultam da conversão de taquizoítos para o estágio de divisão mais lenta formando cistos teciduais (Figura 1C). Encontrados em tecidos cerebrais ou musculares, os cistos teciduais, apresentam um metabolismo latente adaptado a sobrevivência a longo prazo ⁶. Durante sua vida útil os cistos permanecem intracelulares e a morte da célula hospedeira desencadeia o

rompimento da parede do cisto com a liberação de bradizoítos². Por serem resistentes a pepsina ácida, são transmitidos através da ingestão⁷. Os esporozoítos (Figura 1D) são estruturas de 12 a 13 µm, que após a esporulação apresentam dois esporocistos contendo quatro esporozoítos² (Figura 1E). O oocisto apresenta uma parede robusta que protege o parasito de danos mecânicos e químicos, o que permite sua sobrevivência por longos períodos⁸. Em áreas quentes, úmidas e de baixa altitude a infecção é frequentemente mais alta, já que os oocistos sobrevivem em ambientes que apresentam estas características⁹.



Figura 1- Estágios infecciosos de *T. gondii.* A- Taquizoítos no interior de macrófagos peritoneais; B- Bradizoítos; C- Cistos tecidual, contendo centenas de bradizoítos; D- Oocisto não esporulado; E- Oocisto não esporulado, indicando dois esporocistos (cabeça das das setas) e um esporozoítos (setas menores). Figura adaptada²

1.2 Ciclo de vida.

O *T. gondii* apresenta um hospedeiro definitivo no qual ocorre a reprodução sexuada (felídeos), e um intermediário no qual ocorre a replicação assexuada (animais de sangue quente, incluindo o homem)¹⁰. Após a ingestão dos cistos e destruição de sua parede, os bradizoítos se estabelecem no interior de enterócitos onde sofrem multiplicações assexuadas². Nesta etapa do desenvolvimento sexual,

há a formação de gametas masculinos e femininos¹¹. Após a fertilização os oocistos no interior dos enterócitos, são liberados e excretados como formas não esporuladas nas fezes dos gatos¹².

No ambiente externo há o processo de esporogonia, com redução meiótica e alterações levando a formação de um oocisto esporulado contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos haplóides¹¹. A liberação dos oocistos ocorre de 3 a 7 dias após a ingestão de cistos teciduais^{2,11}. No ambiente, os oocistos infectam os hospedeiros intermediários por ingestão de comida ou água contaminados. No interior das células dos hospedeiros intermediários, o parasito desenvolve-se assexuadamente. Após a ingestão de oocistos, os esporozoítos são liberados, penetrando no epitélio intestinal se diferenciando em taquizoítos². Os taquizoítos se replicam por endodiogenia no interior de células nucleadas e se disseminam no hospedeiro¹³. Quando os taquizoítos se diferenciam para bradizoítos, surgem então os cistos teciduais que podem permanecer por toda a vida no hospedeiro, no cérebro ou musculatura¹. Com a ingestão destes cistos pelo hospedeiro intermediário, em carnes cruas ou malcozidas, há a liberação de bradizoítos². Se a fase aguda da infecção ocorre na gravidez, o parasito atravessa a placenta causando danos ao feto⁵.



Figura 2- Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Biologia, infecção e replicação dos estágios infectantes do parasito em seus hospedeiros. Figura adaptada¹¹.

1.2.1 Aspectos epidemiológicos da Toxoplasmose.

1.2.1.1 Toxoplasmose em humanos.

A toxoplasmose tem uma ampla distribuição e uma taxa humana global de 25-30%¹⁴. Em imunocompetentes a toxoplasmose é controlada pela resposta imune do hospedeiro na fase aguda da infecção, porém em alguns casos pode levar ao comprometimento ocular, tanto na fase congênita (na primo-infecção materna), como após o nascimento. Estima-se que um terço da população mundial possa ter anticorpos para toxoplasmose. Os índices de soropositividade podem ser

relacionados a fatores climáticos⁹, socioeconômicos, culturais, geográficos e hábitos alimentares⁸.

Na América Latina a prevalência para toxoplasmose pode variar de 40% a 70%⁸. No Brasil, estima-se que 60% da população adulta da Grande São Paulo seja soropositiva para o *T. gondii*¹⁵, porém esses índices podem ser diferentes em populações do Norte e Sul do país, devido aos diferentes hábitos alimentares¹⁶. A prevalência da infecção foi estudada desde regiões como Amazonas até a Região Sul do país, mostrando que a soroprevalência alcança de 50% a 83%, e que esse aumento varia de acordo com idade, nível sócio cultural e consumo de água não tratada. A prevalência da infecção em 5 populações diferentes na região Amazônica, variou de 56,2% a 73,9%, e em estudo realizado em 3 diferentes populações indígenas brasileiras, constatou-se uma prevalência de 55,6% a 80,4%¹⁷. Em países tropicais como Colômbia e Venezuela, a prevalência é maior em relação a locais áridos ou regiões frias, e em regiões com maior altitude a prevalência é menor comparada a regiões sob o nível do mar⁹.

A prevalência de toxoplasmose congênita, varia entre as regiões. Estudos mostraram uma prevalência de 91,6% de toxoplasmose congênita no Estado do Mato Grosso do Sul¹⁸, enquanto no Paraná¹⁹, essa prevalência foi de 49,2%. Em contrapartida no Rio Grande do Sul, estudos mostraram que a cada 1.000 nascimentos no estado, 1,2 são afetados pela toxoplasmose congênita²⁰. De acordo com o trimestre da gravidez a infecção pode levar a danos oculares e até cegueira. Os recém-nascidos infectados podem não apresentar sinais clínicos ao nascer, e posteriormente a infecção pode se manifestar com corioretinite, lesões oculares, e em casos extremos a toxoplasmose pode levar a calcificações cerebrais e até mesmo retardo mental com comprometimento sensorial, ou até mesmo aborto²¹. Em países como os EUA, cerca de 400 a 4000 casos de toxoplasmose congênita foram documentados²², enquanto em países europeus como França e Áustria, estima-se

que a cada 1000 nascimentos, 3 a 4 nascimentos sejam afetados pela toxoplasmose congênita²³. No Estado de São Paulo, estima-se que cerca de 230 a 300 crianças sejam infectadas por ano²⁴.

A reativação da infecção latente em pacientes imunocomprometidos tem alta relação com a toxoplasmose²⁵. Em pacientes portadores da AIDS, o parasito desenvolve uma série de sintomas, sendo encefalite o mais frequente, com a rápida multiplicação dos taquizoítos há a destruição de tecidos neurais²⁵. Nestes indivíduos pode ocorrer a reativação da infecção pela presença de cistos latentes, com a liberação de bradizoítos, que se transformarão em taquizoítos levando a um quadro grave da infecção (principalmente lesões cerebrais)²⁶. Na África, 50% dos indivíduos portadores de AIDS desenvolvem encefalite relacionada a toxoplasmose²⁷. Nos EUA, cerca de 20% a 25% dos pacientes portadores de AIDS, desenvolvem a doença e apresentam algum agravante²³. Nos anos de 1988 e 1991 em São Paulo, 21% a 46% dos casos de encefalite em pacientes com AIDS estavam relacionadas a toxoplasmose, mostrando uma prevalência de 12,2% dos casos¹⁵.

1.2.1.2 Toxoplasmose em animais.

Animais destinados ao consumo humano quando infectados por *T. gondii*, além de serem fontes de contaminação, representam prejuízos econômicos aos seus criadores, devido a abortos e mortes neonatais²⁸. Estima-se que no Uruguai ocorra perda de 1,4-3,9% dos ovinos em fase gestacional, com um prejuízo em torno de US\$ 1,4-4,7 milhões de dólares²⁹. No Brasil a presença do parasito em animais destinados ao consumo é de cerca de 9% dos suínos³⁰, 11% dos bovinos, 17% dos caprinos e 31% dos ovinos³¹. Quando se trata da prevalência da infecção em caprinos, que são uma importante fonte de carne e leite em países subdesenvolvidos, a soropositividade alcança 77%. A soroprevalência de *T. gondii* em ovinos em países
europeus alcançam 92%, já que a carne de cordeiro crua e malcozida é considerada uma iguaria, sendo uma importante fonte de infecção nos países³². Em países como a Holanda 30,9% dos suínos e 38,5% dos ovinos apresentam positividade para infecção, reafirmando a importância do consumo de carne como uma das fontes de contaminação humana⁹.

1.3 Imunidade na Toxoplasmose.

O processo de invasão inicia a partir do contato do taquizoíto com a célula hospedeira. Há uma reorientação do parasito, que se posiciona perpendicularmente à superfície celular através de seu polo apical³³. No momento de sua adesão, o parasito secreta a partir das róptrias e micronemas, vesículas que irão se fundir com a membrana do vacúolo^{34,35} (Figura 3). Após a invasão do parasito 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 lisossomos³⁴. O *T. gondii* pode ser caracterizado como um excelente imunógeno capaz de induzir uma resposta imune inata e adaptativa. A invasão do parasito na célula, desencadeia uma ativação não específica de macrófagos e células natural killer (NK), esta ativação limita a proliferação do parasito³⁶. Em camundongos, a ativação de macrófagos ocorre pela produção de IFN-y na presença de TNF-a, dando origem a atividade citotóxica dos macrófagos contra o T. gondii ³⁷. A inibição da sua replicação e sua destruição, é resultado de mecanismos efetores como mecanismos oxidativos e não oxidativos, pela produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados por IFN-γ, envolvendo NO durante a fase crônica, inibindo a proliferação cerebral do parasito³⁶(Figura 3).

Durante a fase tardia da infecção, a combinação da ação de células NK e macrófagos ativados por IFN-γ, exercem a imunidade inata restrita ao complexo

principal de histocompatibilidade (MHC)³⁸. Neste estágio, macrófagos diferenciam-se em células apresentadoras de antígenos (APC). Neutrófilos, eosinófilos e mastócitos também agem no local da infecção, e também estão envolvidos com a resposta imune inata através da produção de fatores pró-inflamatórios como a IL-12³⁷. Células como os fibroblastos, células epiteliais e endoteliais também são capazes de diminuir a proliferação do parasito a partir de mecanismos ferro dependentes, iNOS, IFN-y e TNF-α³⁹. 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 reposta imune⁴⁰. Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são as principais células envolvidas na resistência do hospedeiro a infecção⁴¹. 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-y, 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 vacinação⁴². A resistência é relacionada a resposta Th1 induzida pelo IFN-y e pela IL-12, ativando células NK e macrófagos³⁸. Contudo, o controle da infecção por T. gondii é relacionado ao resultado da ação entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Linfócitos T CD8⁺ são ativados por proteínas da superfície do parasito⁴¹, e parecem ser essenciais durante a fase ativa da infecção, sendo relacionado a imunidade protetora³⁷. Linfócitos T CD8⁺ ativados pela IL-2 excretados por células T CD4⁺, exercem uma atividade citotóxica contra taquizoítos ou células infectadas pelo T. gondii 43.

A produção de IFN-γ é observada 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 T CD8⁺⁴⁴. Entretanto, o IFN-γ provoca a conversão de taquizoítos em bradizoítos ao mesmo tempo em que impede sua ruptura⁴⁵. A IL-12 desempenha um

papel importante na toxoplasmose, durante a fase aguda da infecção, ativando IFNγ por células NK e células T CD4⁺ e T CD8⁺. A IL-12 também é essencial durante a fase crônica da infecção mantendo a resposta imune durante muito tempo⁴⁶. Estudos utilizando a combinação de IL-12 e a proteína recombinante SAG1, demonstraram resposta imune do tipo Th1 com alta produção de IFN-γ¹¹. O TNF- α exerce a ativação de macrófagos e inibição da replicação do parasito associado ao IFN-γ, esta ação é observada em camundongos, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença⁴⁷. O TNF-α assim como a IL-12, também estimulam a produção IFN-γ por células NK, que desempenham um papel crucial no início da resposta inata durante a toxoplasmose⁴⁸.



Figura 3- Imunidade na toxoplasmose. Esquema demonstrando a invasão de taquizoítos na célula hospedeira e as respostas imunes, inata e adaptativa, na infecção por *T. gondii*.

1.4 Vacinas para Toxoplasmose.

Como anteriormente descrito, a transmissão da toxoplasmose para humanos,

ocorre a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos teciduais,

ou ingestão de oocistos presentes nas fezes dos gatos. Com isso, há a necessidade de medidas profiláticas que agiriam em sua prevenção, o que poderia ocorrer a partir da imunização. Uma vacina poderia agir na prevenção da doença clínica em humanos; prevenção da infecção em animais destinados ao consumo humano, evitando a sua transmissão; a imunização de felinos domésticos, interromperia o ciclo, e consequentemente a contaminação ambiental com oocistos.

A imunização de animais com antígenos isolados, parasitos inativados ou cepas mutantes, são extensamente testadas, porém com níveis de proteção pouco satisfatórios. Atualemte a única vacina comercial para toxoplasmose é a Toxovax®, de uso exclusivo veterinário, utilizada na Nova Zelândia, para imunização de ovinos, produzida a partir de taquizoítos da cepa S-48²⁸. A imunização de ovelhas, com posterior desafio com oocistos, mostrou eficiência parcial na proteção, com aproximadamente 70% dos fetos livres da infecção, protegendo estes animais de aborto por até 18 meses. Contudo, essa vacina viva apresenta vida útil curta e demanda cuidados com sua administração por se tratar de um patógeno zoonótico⁴⁹. Além disso modelos vacinais utilizando cepas atenuadas podem apresentar recuperação da virulência em animais jovens, promovendo a infecção com formação de cistos teciduais⁵⁰.

Até o momento não existem vacinas destinadas a toxoplasmose capazes de prevenir infecções congênitas ou a formação de cistos. Com o advento da biologia molecular, a tecnologia da proteína recombinante e as dificuldades de se obter o crescimento de parasitos em larga escala, diversos antígenos de *T. gondii* produzidos em bactérias foram testados em vacinas. Vacinas baseadas nas proteínas recombinante SAG1 pareciam ser um alvo na proteção contra toxoplasmose aguda⁵¹, porém a proteção completa contra a doença aguda ou toxoplasmose crônica em camundongos só foi obtida pelo uso de fortes adjuvantes, como o completo de Freund's e QuilA⁵². Vacinas de DNA apresentam dificuldades em relação a sua

imunogenicidade^{53,54}. Os melhores resultados com vacinas de DNA obtidos para toxoplasmose, foram obtidos da imunização com a combinação de SAG1 com ROP2⁵⁵. Diante disso, o uso de vacinas produzidas a partir de um maior espectro de proteínas antigênicas, e não só a partir de um único epítopo, nos leva a crer que o uso da radiação ionizante poderia induzir uma melhor apresentação de antígenos na ausência adjuvantes.

A irradiação de parasitos como *T. gondii*, foi utilizada inicialmente com o objetivo de eliminar a infectividade dos cistos em carnes contaminadas⁵⁶, ou de suas formas infectantes, oocistos⁵⁷. Nosso grupo demonstrou que taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* irradiados a 200Gy⁵⁸, induziam uma resposta imune humoral similar aos tratados, demonstrando que a essa dose os parasitos preservam suas características bioquímicas, integridade celular e processos invasivos mas sem reprodução após a invasão celular, induzindo uma imunidade similar a infecção natural, que é protetora de reinfecções⁵¹.

1.5 Radiação ionizante.

A radiação como ferramenta útil na produção de imunógenos vacinais é descrita desde 1950 ⁵⁹. Estudos com radiação gama^{58,60,61}, raios-X⁶² e radiação ultravioleta⁶³, agem na atenuação e esterilização dos agentes, e ensaios celulares mostram que a sua ação é na maioria das vezes relacionada a perda de sua capacidade reprodutiva, mas com manutenção das características imunogênicas. A radiação ionizante age de diversas formas sobre os agentes, além do seu efeito esterilizante também foi associada ao aprimoramento de imunógenos em hanseníase⁶⁴ ou na produção de antissoros contra venenos⁶⁵.

Os efeitos da radiação gama ionizante podem causar danos diretos ou indiretos sobre as moléculas dos seres vivos⁶⁶. Nos danos diretos, ocorre a

transferência de energia para a molécula alvo, provocando ionização e alterações nas estruturas químicas e biológicas. Nos danos indiretos, ocorre a interação da radiação gama com moléculas do meio, principalmente água, molécula mais encontrada nos sistemas biológicos formando hidrogênio molecular (H₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical livre como hidroxila (OH[•]), que parece ser o principal responsável pela agregação das proteínas, devido a formação de ligações cruzadas entre elas⁶⁷, elétron aquoso (e⁻aq), átomos de hidrogênio (H•) e peroxila (H0₂•)⁶⁸. Ácidos nucleicos e proteínas são as principais moléculas afetadas, e os fenômenos relacionados a alterações de proteínas induzidas pela radiação diretamente ou decorrentes da radiólise da água, demonstraram-se como responsáveis por uma melhor resposta imunológica⁶⁷.

1.6 Vacinas e radiação ionizante.

Um breve histórico do uso da radiação gama ionizante, mostra o seu o seu potencial como ferramenta no aprimoramento de vacinas. O uso da radiação foi satisfatório para helmintos. A irradiação de ovos e miracídios de *Schitosoma mansoni*⁶⁶ com doses de 5 a 2000Gy com Co-60, mostrou que ovos e miracídios irradiados não se desenvolveram. A imunização de camundongos com cercárias irradiadas de 150 a 250Gy, diminuiu a carga de vermes pós-desafio em até 90%⁶⁹. Em protozoários, esporozoíto de *Eimeria tenella*, um protozoário coccidio, foram observados danos nos mecanismos reprodutivos, resultando em esterilização dos mesmos⁷⁰. Na toxoplasmose, inicialmente a irradiação foi utilizada como ferramenta esterilizante de carnes, para prevenir a infectividade de cistos⁵⁶ ou oocistos⁵⁷.

Organismos nucleados tem sido um desafio na produção de vacinas. Vacinas para fungos⁷¹, protozoários⁷² e metazoários⁷³ têm sido tentadas de inúmeras formas,

Da Costa, A., 2019

mas o melhor resultado induz imunidade semelhante à infecção natural, o que nem sempre é efetivo, já que estes agentes produzem múltiplas infecções como no caso da malária⁷⁴. O uso de vacinas atenuadas com cepas menos virulentas não é viável nestes agentes, e a infecção residual causada pela vacinação, pode ser reativada em condições clínicas como imunossupressão por infecções ou tratamentos, tendo sua aplicação voltada apenas ao uso veterinário em animais não destinados para produção de carne²⁸. A única vacina estéril existente contra protozoários do filo Apicomplexa foi produzida pela radiação ionizante⁷⁵, representando a primeira geração de vacinas esterilizadas pela exposição a radiação⁷⁶. Desde 1970, estudos em humanos⁷⁷ demonstraram que esporozoíto atenuados pela radiação são potentes indutores de imunidade protetora e são imunógenos seguros pois não dão origem as infecções eritrocitárias na fase assexuada na infecção por malária⁷⁸.

Na maioria dos estudos de irradiação de parasitos como *T. gondii*^{68,60}, outros protozoários⁷⁹ ou helmintos⁸⁰, observa-se a ação da radiação ionizante a nível genômico, metabólico ou fisiológico do agente não levando em conta também a ação da radiação sobre as proteínas do agente, e quais os mecanismos envolvidos na melhor captação e apresentação de antígenos após a irradiação por raios gama. Sabe-se que o efeito da radiação sobre proteínas em solução aquosa é extremamente dependente dos efeitos da radiólise da água, o que causa a liberação de fatores oxidantes ou formação de pontes moleculares⁶⁶. Estudos utilizando crotoxina irradiada, mostraram que proteínas irradiadas eram preferencialmente processadas por macrófagos⁸¹. Estes resultados mostraram que as alterações induzidas nas proteínas de um antígeno, poderiam resultar no aprimoramento de sua apresentação, melhorando sua resposta imune, permitindo a exclusão do uso de adjuvantes, o que seria importante em vacinas destinadas para o uso humano.

O uso de vacinas produzidas a partir de um maior espectro de proteínas antigênicas, e não só a partir de um único epítopo, nos leva a crer que o uso da

radiação ionizante pode induzir uma melhor apresentação destes antígenos. Apesar das vacinas produzidas a partir de parasitos irradiados serem eficazes e promissoras, as mesmas ainda apresentam dificuldades de cultivo em larga escala e na logística da conservação das doses vacinais⁵⁰. Sendo assim, o uso de proteínas associadas aos efeitos da radiação ionizante em proteínas, poderia ser uma ferramenta importante no desenvolvimento alternativo de modelos vacinais.

1.7 Adjuvantes.

Adjuvantes foram descritos pela primeira vez por Ramon (1924)⁸² como uma substância utilizada em combinação a um antígeno específico que produz uma resposta imune mais potente que o antígeno desacompanhado. Diversos compostos foram avaliados como adjuvantes incluindo sais minerais, produtos antimicrobianos, emulsões, saponinas, citocinas, polímeros, micropartículas e lipossomas⁸³.

Para desencadear respostas imunes, os adjuvantes apresentam 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)⁸². Após o reconhecimento do antígeno as células ativadas irão migrar até órgãos linfóides locais onde irá ocorrer o desenvolvimento da resposta imune específica⁸⁴. De acordo com a sua classificação adjuvantes podem ser: imunoestimulantes ativos, caracterizados por aumentar a resposta imune ao antígeno⁸⁵; transportadores apresentando as proteínas imunogênicas com ajuda de células T⁸⁶; adjuvantes de veículo, como óleo emulsões ou lipossomas, servindo de matriz para estímulo da resposta imune pelo antígeno⁸⁷.

Apesar do aumento nos estudos para o desenvolvimento de formulações adjuvantes potentes nos últimos 80-90 anos, compostos de alumínio ainda são mais comumente usados para vacinas humanas de rotina⁸⁸. Uma questão amplamente discutida no desenvolvimento de adjuvantes para vacinas humanas são as reações adversas⁸² e a dosagem administrada, para evitar a eventual toxicidade do alumínio adsorvido⁸⁴. Adjuvantes podem ou não agir a certos antígenos⁸⁹. Compostos de alumínio não mostraram efeito adjuvante quando utilizado na vacina para febre tifóide⁹⁰, ou junto ao antígeno hemaglutinina da gripe conjugado ao toxóide tetânico⁹¹. Proteínas como a ovalbumina (OVA) e hemaglutinina de influenza, também são extensamente estudados como imunoestimulantes⁹². Contudo, estudos em animais, mostram que para induzir alguma resposta imune, há a necessidade do uso de altas concentrações de OVA, concentrações estas que ultrapassariam as doses máximas permitidas, e dificultariam detectar uma diferença significante entre antígeno e adjuvante⁹³.

A ação da radiação parece transformar a resposta imune à proteína como um adjuvante, mas este esclarecimento é complexo. Alguns adjuvantes funcionam como insolubilizadores das proteínas, como o alúmen⁹⁴ e a radiação também promove a formação de agregados proteicos, as vezes poucos solúveis⁹⁵. O dano genômico da radiação sobre parasitos íntegros pode gerar uma associação semelhante, com relativa precipitação e agregação de proteínas em restos do agente após a morte mitótica⁵⁸. A radiação oxida as proteínas a partir da radiólise da água e isto é semelhante à oxidação que ocorre nos tecidos após a inflamação⁹⁶ ou com o uso de alguns adjuvantes, que também geram inflamação local, como o adjuvante completo de Freund s⁹⁷. Um antígeno irradiado passa por alterações como agregação de proteínas, quebras de cadeias e reações oxidativas. Estas alterações são reconhecidas por receptores presentes em células de "limpeza" dos tecidos, os

macrófagos, que por sua vez também podem vir a ser as células responsáveis pela apresentação de antígenos.

1.8 Vacinas.

Vacinas representam um grande triunfo da medicina moderna sendo um ponto importante na luta entre patógenos e humanos⁹⁸. Apesar do saneamento básico e antibiótico terem salvado vidas, vacinas ainda são as formas mais rentáveis com este intuito. As vacinas podem ser classificadas como: vacinas vivas atenuadas, vacinas inativadas, vacinas de subunidades (recombinantes, polissacarídeos e conjugadas) e vacinas de toxóide.

Vacinas vivas são produzidas a patir da forma enfraquecida (atenuada) do organismo causador da doença. Sua ação é semelhante à infecção natural, induzindo uma resposta imune forte e duradoura ⁹⁹. Vacinas vivas são usda na proteção contra: sarampo, caxumba, rubéola (vacina combinada MMR), rotavírus e varíola¹⁰⁰. Vacinas inativadas são produzidas a partir do organismo causador da doença morto. Geralmente não são fortes indutoras de proteção, assim há a necessidade de diversas doses de reforço ao longo do tempo para se obter imunidade contra a doença alvo. Fazem parte deste grupo vacinas contra Hepatite A, vacinas contra influenza, Polio e raiva¹⁰¹. Vacinas de subunidade (recombinantes, polissacarídeos e conjugadas), utilizam epítopos específicos do organismo, como proteínas e polissacarídeos conjugados. Apresentam algumas limitações, havendo a necessidade de doses de reforço para uma proteção duradoura, assim em suas formulações há a presença de adjuvantes, para ampliarem a qualidade da resposta imune. Estão neste grupo, vacinas contra a *Haemophilus influenzae* tipo B¹⁰², Hepatite B, Vacina contra pneumococo e meningococo¹⁰³. Por fim, vacinas toxóide,

Da Costa, A., 2019

utilizam a toxina proveniente do organismo, o que significa que a resposta imune induzida será direcionada para a toxina e não para o organismo causador¹⁰⁴. Vacina toxóide são usada para proteção contra, difeteria e tétano¹⁰³.

Funcões imunológicas são de extrema importância para se observar as respostas específicas ao agente induzidas pela vacina¹⁰⁰. Essas funções são divididas em resposta humoral, respostas por células B de memória, respostas por células T CD4⁺ auxiliares ou células T CD8⁺. Na resposta humoral há a secreção de anticorpos (IgG, IgM e IgA secretora). Células T CD4⁺ auxiliam células B e células T CD8⁺ a combater células infectadas¹⁰⁵. Na sua maioria, as vacinas induzem produção de anticorpos no soro ou na mucosa bloqueando a adesão dos agentes patogênicos às células epiteliais ou interferindo a invasão microbiana a corrente sanguínea¹⁰⁶. 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 neutralizála¹⁰⁷. Para que ocorra a produção de células B de memória é necessário que aconteça um processo de seleção caracterizado por afinidade e maturação¹⁰⁸. Após a vacinação, ocorrem hipermutações nos genes de imunoglobulinas das células B e as que expressarem anticorpos de alta afinidade em sua superfície para o antígeno da vacina são selecionadas para persistência como células B de memória específicas¹⁰⁹. Vacinas induzem a produção de células de memória, para que numa nova infecção ocorra rápida produção de resposta imune, tanto com anticorpos circulantes ou com a ativação de células CD8, combatendo a infecção com muito mais eficiência¹¹⁰.

A medida da eficiência de uma imunização depende da medida da imunidade produzida, já que a alternativa seria medir a proteção ao desafio do vacinado com a doença. A produção isolada de anticorpos é uma medida factível e simples, mas nem sempre é proporcional a imunidade protetora desejada¹¹¹. A medida de anticorpos

Da Costa, A., 2019

pode ser feita por técnicas simples como ELISA, aperfeiçoada pela mensuração da maturação da afinidade dos anticorpos, medida pela avidez dos anticorpos⁹⁷. A qualidade de um anticorpo depende tanto de sua especificidade, mas também da afinidade com que o anticorpo reage com seu epítopo específico, o que é uma medida indireta da qualidade da imunização. Em geral, a maturação de um anticorpo, depende de sinapses mais complexas no centro germinativo que envolve uma maior cooperação celular, que vai além da ativação de células B antígeno específica¹¹². A vacinação deve gerar respostas celulares de memória, tanto efetora via CD8⁺ como para o lado de células CD4⁺ auxiliar e células B de memória.

Para que ocorra a imunidade adaptativa os antígenos devem ser processados e apresentados às células do sistema imune¹¹³. Esta apresentação é mediada por moléculas MHC de classe I e classe II presentes na superfície de APCs. Moléculas de MHC são responsáveis pela apresentação de peptídeos na superfície celular, permitindo que estes sejam reconhecidos por células T CD8⁺ e T CD4⁺⁸⁵. Um peptídeo de origem exógena será apresentado via MHC de classe II, enquanto um peptídeo de via endógena ou intracelular é apresentado via MHC de classe I¹⁰⁹. Há ainda um processo pelo qual antígenos exógenos podem ser apresentados via MHC de classe I, e peptídeos exógenos degradados por autofagia são apresentados via MHC de classe II, enquanto um resposta citosólica¹¹⁴, e além de processos conhecidos como a fagocitose e macropinocitose, o antígeno pode ser endocitados por receptores Fcq¹¹⁵ e receptores *Scavenger*¹¹⁶, e posteriormente apresentados para células T CD8 pelas APcs.

1.9 Receptores Scavenger.

Receptores *Scavenger* foram inicialmente identificados por sua capacidade de reconhecer e remover lipoproteínas modificadas¹¹⁷. Porém, estudos recentes

mostram que eles realizam diversas funções, incluindo a eliminação de patógenos, transporte lipídico e o transporte de cargas no interior celular¹¹⁸. Devido ao amplo repertório de ligantes, estes receptores são capazes de se associar a diferentes co-receptores, tornando sua capacidade de resposta extremamente versátil. Estes receptores foram descritos pela primeira vez por Goldstein e Brown em 1979¹¹⁹. Suas atividades foram relacionadas a sua capacidade de se ligar e internalizar lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL). Sua afinidade por lipídios e patógenos modificados parecem estar ligadas no metabolismo de processos inflamatórios. De acordo com sua função esses receptores foram classificados seguindo seus determinantes estruturais (Figura 4). Assim, receptores *Scavenger* de classe A, apresentam um domínio de colágeno, e também podem ter um domínio rico em cisteínas (SRCR) ou de lectina C (CLEC)¹²⁰. Os receptores de classe B, com o CD36 apresentam domínios glicoproteicos associados a lisossomos¹¹⁹. Existem ainda os receptores da classe E, com um domínio de lectina, e os de classe F, que são ricos em domínios do fator de crescimento epidérmico¹²¹.



Figura 4- Representação dos membros da família de receptores Scavenger, indicando seus domínios. Figura adaptada¹²².

Receptores *Scavenger* apresentam vasta literatura, descrita para suas funções na aterosclerose¹²³, e sua ligação com a imunidade ainda é recente, mostrando que estes receptores podem estar relacionados a imunidade inata e adaptativa e no estudo voltados para fagocitose de moléculas¹²⁴. Estudos mostram que a captação de antígenos associados a corpos celulares apoptóticos são realizados por receptores *Scavenger* como, complemento^{125,126}, CD91, α ,v integrinas¹²⁷ e pelo CD36¹²⁸.

A apresentação de antígenos ainda é um assunto controverso, principalmente no que se diz respeito a forma como os peptídeos antigênicos irão se ligar na cadeia nascente do MHC, via vesículas celulares para finalmente serem expostos como complexos montados na superfície celular. Evidentemente nestas etapas o fator principal para que ocorra a apresentação é a seleção do antígeno, que deve ser um processo seletivo e lucrativo. A digestão celular ocorre todo o tempo, por processos de autofagia ou fagocitose. A maioria das proteínas presentes na célula hospedeira não apresentam células imunes responsivas pela deleção clonal na vida fetal, o que resultaria na inutilidade do MHC¹²⁵. Diante disso receptores especializados, como o SR-A ou o CD36, descritos como moléculas capazes de reconhecer ligantes negativos, apoptóticos ou oxidados¹²⁹, seriam moléculas importantes na etapa de seleção e apresentação de peptídeos ao MHC.

Assim que um peptídeo é internalizado pelo fagossomo inicial, essa vesícula poderá se fundir com vesículas vindas do retículo endoplasmático (RE) e do Complexo de Golgi, formando um fagossomo intermediário^{130,131}. Essas vesículas são uma forma de entrada para produtos extracelulares e para reciclagem de produtos da membrana. APCs ativadas migram para órgãos linfoides e apresentam o antígeno para células T, dando início a resposta imune adaptativa¹³². Processos como estes dependem de actina e proteínas reguladoras, que durante a endocitose produzem "forças" para internalizarem vesículas da membrana plasmática¹³³. Existem dois revestimentos principais das vesículas endocíticas, que geram diferentes vias intracelulares (Figura 5). Quando a vesícula é revestida por clatrina, esta vesícula adquire a propriedade de fusão com lisossomos e extensa digestão do seu conteúdo. Em geral, esta vesícula é decorrente de absorção de proteínas externas ligadas a receptores¹³⁴. A caveolina é uma proteína semelhante a clatrina, mas que parece estar envolvida na circulação de estruturas da célula, em processos autofágicos¹³⁵. Estes dois sistemas têm ligação com peptidases e causam muita degradação proteica, gerando eventualmente peptídeos maiores em seu vacúolo digestivo, e agem como estradas para o transporte de vesículas para o RER onde os peptídeos serão processados e entregues a moléculas do MHC e expostos na superfície celular para células T¹³⁶. Um terceiro sistema de vesículas seria o sistema de rafts de membrana, ou de lipídios, decorrente da circulação de lipídios e ácidos graxos livres no interior da célula¹³⁷. Por sua constituição lipídica e ausência de



receptores específicos, ele não tem a ligação de lisossomos, mas seu conteúdo é de livre trânsito intracelular, com pouca acidificação e pouca digestão proteica¹³⁸.

Figura 5 - Esquema (A) das diferentes vias intracelulares e (B) os principais revestimentos de vesículas endocíticas.

Este sistema de vesículas de transporte lipídico está intimamente ligado ao CD36¹³⁹. Cada receptor *Scavenger* tem a sua especificidade química e, portanto, também deve ter sua especificidade de via de tráfico intracelular¹⁴⁰. Esta molécula apresenta um canal interno de passagem de ácidos graxos livres, com um receptor de produtos lipídicos oxidados na sua entrada. Assim, o CD36 funciona muito bem na formação de acúmulos lipídicos para a célula, patologicamente expressos como aterosclerose¹⁴¹. A ausência de digestão proteica dentro deste sistema de vesículas torna pouco provável a apresentação de antígeno via MHC, mas as vesículas têm fusão como o RER e seu conteúdo poderia alcançar facilmente as cadeias nascentes de MHC^{118,140}. A classe A de receptores *Scavenger* reconhecem estruturas com carga negativa e tem por função reconhecer células mortas do hospedeiro que precisam ser reprocessadas¹¹⁷. Esta classe de receptores reconhece as células

apoptóticas e seus restos, fagocitando o material e internalizando em vesículas recobertas de clatrina provavelmente ou mesmo caveolinas para digestão lisossomal¹⁴². Uma vez digeridos, estes peptídeos poderiam chegar ao RER e se ligar ao MHC. De todos os sistemas de vesículas, o que parece mais atrativo para a apresentação seria o de *rafts* de lipídios via CD36, apesar da pouca presença de proteases, este sistema apresenta um receptor mais específico que os receptores da Classe A, mostrando a possibilidade da entrega de um antígeno praticamente intacto para a ligação com o MHC, imaginando-se que o processamento proteolítico possa ocorrer após a ligação com o MHC.

2 JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma parasitose de ciclo evolutivo complexo, apresentando felídeos como hospedeiros definitivos, no qual ocorre a reprodução sexual e produção de oocistos infectantes, e mamíferos de sangue quente incluindo o homem, onde ocorre a replicação assexual, que resulta em cistos residuais em tecidos estáveis. O agente induz imunidade protetora na doença crônica, e sua vacinação não deve resultar em doença aguda grave ou cistos teciduais viáveis. Inicialmente, as vacinas mais estudadas para toxoplasmose foram voltadas para a proteção de animais de produção em veterinária, usando agentes vivos atenuados, ou vacinas comerciais utilizando cepas que produzem menor número de cistos, resultando em uma infecção com cistos latentes que previnem as perdas fetais, mas inutilizam a carne para o consumo humano. Atualmente o alvo das pesquisas em vacinas para toxoplasmose tem sido o uso de proteínas recombinantes, isoladas ou associadas, porém os resultados de proteção mostram a necessidade do uso de múltiplos epítopos cooperantes para se induzir uma imunidade efetiva. Estas vacinas propostas com proteínas isoladas, recombinantes ou sintéticas são testadas por ensaios de desafio utilizando cepas viáveis ou somente mostrando a reatividade de anticorpos específicos.

O uso de taquizoítos RH íntegros irradiados, com dose esterilizante de radiação gama, foi capaz de proteger animais previamente imunizados e desafiados com diferentes cepas do agente, além de induzir anticorpos e imunidade celular específica, estabelecendo padrões de determinação da carga de cistos no animal⁶⁰. Esta eficiência depende da conservação das unidades vacinais em nitrogênio líquido, o que inviabiliza seu uso em campo. Neste modelo, o efeito da radiação ionizante parece ocorrer a nível genômico, agindo na quebra do DNA do agente e impedindo sua divisão após a invasão na célula hospedeira^{58,60}. Outro efeito pode estar

associado a melhor exposição de antígenos irradiados que se mostraram imunógenos potentes⁶⁶. Este tipo de vacina oferece os mesmos antígenos que a infecção, sem sintomas e sem a formação de cistos nos tecidos, atingindo assim os objetivos de vacina para toxoplasmose.

A ação da radiação ionizante vai além das modificações fisiológicas do agente e sua morte, com exposição adequada de antígenos⁵⁸. Sabe-se que a radiação ionizante age sobre proteínas, e que proteínas irradiadas são eficientes na indução de imunidade⁶⁵, assim seria importante definir quais as diferenças bioquímicas e estruturais que ocorrem nas proteínas de STags irradiados, que poderiam justificar esta imunidade aprimorada.

Um antígeno irradiado passa por alterações como agregação de proteínas, quebras de cadeias e reações oxidativas. Estas alterações são reconhecidas por receptores presentes em células de "limpeza" dos tecidos, os macrófagos, que por sua vez também podem vir a ser as células responsáveis pela apresentação de antígenos. Estas células precisam identificar o tipo de antígeno exposto, se é oriundo de uma célula apoptótica e dever ser digerido e não processado para apresentação, ou se tem modificações que sugerem reações inflamatórias, e deve ser direcionado para apresentação de antígenos. Receptores do tipo Scavenger são responsáveis pela "limpeza" tecidual e são classificados de diversos tipos: como o SR-A destinados a limpeza e reutilização de restos de células mortas nos tecidos; ou relacionados a resposta inflamatória como o CD36, que leva a um processamento intracelular diferente e ligação às moléculas do MHC dirigidos para a apresentação imune adaptativa. Adjuvantes usados em imunógenos tentam promover este tipo de seleção e direcionamento para a resposta imune adaptativa tornando vacina mais eficientes⁸⁹. Sua ação parece estar relacionada parte a insolubilização de misturas antigênicas e parte por permitir a atração de neutrófilos, cuja potente mieloperoxidase extracelular promove alterações oxidativas em proteínas. A radiação ionizante

Da Costa, A., 2019

poderia simular esta oxidação e alterar as proteínas para seu direcionamento a receptores celulares especializados em APCs, com maior captação e apresentação seletiva na resposta imune adaptativa. Trabalhos com crotoxina irradiada mostraram uma captação seletiva *in vitro* por macrófagos, inibida por probucol⁸¹ um bloqueador de captação de produtos oxidados, como lipídios¹⁴³. O estudo da captação dos STags irradiados por estas células *in vitro* poderia elucidar sua captação tecidual e mostrar qual o destino que o macrófago poderia dar para as proteínas, na dependência do seu reconhecimento pelas vias de captação do macrófago, desde que criássemos sistemas que permitissem o acompanhamento e a quantificação de sua captação. Uma melhor compreensão destas etapas permitiria demonstrar se estas modificações podem ser a chave para produção de uma vacina segura para toxoplasmose, de processamento eficiente sem o uso de adjuvantes, capaz de prevenir a doença humana ou veterinária uma vez que não inviabilizaria carnes para o consumo humano.

3 OBJETIVOS

3.1.1 Gerais

Avaliar os mecanismos de reconhecimento e processamento imune de antígenos solúveis de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* (STag) aprimorados por radiação gama de Cobalto-60 (Co-60) em modelos experimentais da Toxoplasmose.

3.1.2 Específicos

- Avaliar os efeitos estruturais (estrutura primária), antigênicos e imunogênicos induzidos em antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii* (STag) irradiados com radiação gama por fonte homogênea de Co-60;
- b. Definição da massa de proteína efetiva para ensaios de imunização e comparação da resposta imune humoral, celular e protetora induzida por STag nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy comparados a taquizoítos íntegros de *T. gondii irradiados* a 255Gy (RH 255Gy);
- c. Identificar a cinética de ligação e processamento dos STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em macrófagos J774 ou macrófagos peritoneais.
 - Avaliar a interferência de bloqueadores de receptores Scavenger na ligação dos STag nativo ou irradiados em macrófagos J774 ou peritoneais.
- d. Avaliar a participação do receptor *Scavenger* CD36 no processamento de STag irradiados e sua imunogenicidade em camundongos *wild type* C57BI/6j (WTCD36^{+/+}) e *knockouts* C57BI/6j CD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os sais e reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise, com água deionizada purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®], Burlington, Massachussets, EUA), apresentando reatividade de 18,2 mega Ω. A fonte de reagentes é citada ao longo do texto.

4.1 Parasitos.

Os parasitos utilizados foram mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Universidade de São Paulo.

4.1.1 Cepa RH virulenta (ATCC n° 50174).

Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, foram mantidos por passagens sucessivas em camundongos *Swiss* ou C57BI/6j. Os animais previamente infectados foram sacrificados por narcose em câmara de CO₂, seguido da lavagem do peritônio com solução salina ou solução salina tamponada com fosfato NaCl 0,15M/Tampão fosfato de sódio 0,01M pH7,2 (PBS), contendo Penicilina cristalina 2500U/mL e Estreptomicina 10mg/mL. Após, os taquizoítos são contados em câmara de Neubauer e inoculados via intraperitoneal (i.p) em novos animais.

4.1.2 Cepa ME-49 cistogênica (ATCC n° 50611).

Cistos da cepa ME-49 utilizadas nos ensaios de desafio dos animais previamente imunizados, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fausto Araújo

(UCLA – University of California, Los Angeles). As cepas foram mantidas através de passagens sucessivas, com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos *Swiss* ou C57BI/6j. Cada animal recebe por via oral (v.o) uma suspensão de 10 cistos/animal em 3mL de PBS pH 7,2 estéril, obtida do macerado de cérebros de camundongos previamente infectados. A quantificação dos cistos é realizada pela contagem de 20µL da suspensão cerebral em lâmina, em microscópio de luz sob objetiva de 40x.

4.2 Animais Experimentais.

Para os experimentos de imunização e desafio foram utilizados camundongos machos Balb/c ou C57BI/6j (isogênicos), com peso variando de 20 a 22g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e camundongos *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-} obtidos no *The Jackson Laboratory*. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavadas, recebendo ração comercial Nuvital e água *ad libitum*. Os animais utilizados foram eutanasiados em câmara de CO₂, com manipulação conduzida de ácordo com as normas de cuidados animais de laboratório¹⁴⁴ e com os "Princípios de ética em experimentação animal" (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Projeto n° **000274A**).

4.3 Obtenção de antígeno solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* para ensaios imunoenzimáticos e de imunização (STag).

Parasitos obtidos do exsudato peritoneal dos animais previamente infectados foram filtrados em membranas de policarbonato de 3,0µm (ISOPORE, Millipore[®]) para remoção de outros tipos celulares presentes no lavado. Os parasitos purificados

foram submetidos a sonicação (Sonic Dimembrator, Quigley-Rochester Inc. USA) em 40 ciclos por 5-10 períodos de 30 segundos, em banho de gelo, até a lise completa doas agentes. Após, acrescentou-se solução de NaCl 0,3M para isotonizar a suspensão que foi submetida a centrifugação a 10000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante solúvel obtido foi alíquotado e utilizado como antígeno¹⁴⁵ para os ensaios imunoenzimáticos e como amostras vacinais para os ensaios de imunizações (STags).

4.4 Irradiação das Amostras de STag.

Os antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii* (STag) obtidos como descrito anteriormente em 4.3, foram submetidos à irradiação, nas doses de 250, 500, 1000, e 1500 Gy com blindagem de 90%, pela exposição a raios-γ por uma fonte de Cobalto-60 (Gamacell, Atomic Energy of Canada), de forma homogênea, com um taxa e dose de 1,03 kGy/h, em temperatura ambiente na presença de oxigênio. Amostras controle permaneceram na parte externa da fonte durante todo o tempo de irradiação, para avaliação de condições ambientais.

4.5 Caracterização das amostras de STag nativo ou irradiados.

4.5.1 Eletroforese - EGPA-SDS.

Amostras contendo de 5-10µg de proteínas, foram adicionadas em 10µL de tampão de amostra (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, Tris-HCl pH 6.8 0.0625M, azul de Bromofenol 0.001% 50%), aquecidas por 5 minutos a 100 °C e aplicadas no gel. A análise de mobilidade eletroforética em sistema descontinuo e denaturante foi realizada segundo Laemmli¹⁴⁶, em sistema Mini-Protean II (BIO-

RAD[®], Hercules, California, EUA, Inc.). O gel de empilhamento foi composto por Acrilamida-Metileno Bisacrilamida (30/0.8) 5% em tampão Tris-HCI 0,125M pH 6,8, SDS 0,1% e gel de resolução contendo Acrilamida/Bisacrilamida 12.5%, tampão Tris-HCI 0.375M pH 8.8, SDS 0,1%. A polimerização química ocorreu pela adição de TEMED e persulfato de amônio. A corrida eletroforética ocorreu na presença de Tris 0.025M-Glicina 0.192M pH 8.3, a 100 V (20-30mA). Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue G-250 0.25%/metanol 45%/ácido acético glacial 5%. Após, os géis foram descorados em solução de metanol 10%, ácido acético glacial 5% e fotografados para posterior análise utilizando os softwares de análise de imagens, ImageJ[®] (instituto Nacional de Saúde, EUA; http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide) e Image Lab[™] (BIO-RAD[®]).

4.5.2 Densitometria.

Para avaliar o efeito estrutural da radiação sobre as proteínas dos STag irradiados utilizamos softwares de análise de imagens ImageJ[®] (instituto Nacional de Sáude, EUA) e Image LabTM (BIO-RAD[®]). Após a calibração das imagens, as mesmas são convertidas para escala de 8-bits (Image-Type_8-bit), e assim mensuramos a área de corrida das proteínas detectáveis. Essa detecção fornece a massa molecular de cada banda detectável, representada por histogramas. Os valores das massas foram adquiridos e submetidos a análise estatística para o cálculo de correlação (r²) entre as bandas detectáveis no do STag nativo (não irradiado) e as bandas detectáveis nos STag irradiados.

4.5.3 Western Blot.

Amostras dos STag nativo ou irradiados, foram separadas por EGPA-SDS como descrito anteriormente e transferidas para membranas de nitrocelulose, em sistema de transferência semi-seco Trans-Blot RD (BIO-RAD[®]). Após a eletroforese o gel foi retirado e colocado sobre membranas de nitrocelulose (Millipore[®], Burlington, Massachussets, EUA), envoltos por folhas de papel filtro embebido em tampão de transferência Towbin¹⁴⁷ (25Mm Tris, 192Mm glicina, 20% metanol, pH 8.5). A transferência foi conduzida a uma amperagem de 10mA por 40 minutos. Após, os sítios de ligação livres foram bloqueados por imersão da membrana de nitrocelulose em solução bloqueadora (PBSTL=leite Molico[®] 5% e Tween-2- 0,02%) por 1 hora sob agitação a 4°C. A seguir, a membrana contendo o antígeno foi incubada com anticorpo primário em diluição adequada seguido de 3 lavagens de 3 minutos em PBS contendo Tween-20 0,02% (PBST). Os anticorpos ligados foram revelados por incubação com conjugados a peroxidase específicos em diluições adequadas. A revelação do conjugado foi realizada utilizando a solução cromógena TMB (*tetra*-metilbenzidina) para membranas (KPL).

4.5.4 MALDI-TOF.

As amostras de STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy foram gentilmente analisadas por espectrometria de massas no laboratório DEMPSTER, localizado na Universidade de São Paulo, com o auxílio da Dra. Maria Anita Mendes. Alíquotas de 1µL de cada amostra foi aplicado na placa de MALDI. As amostras são secas em temperatura ambiente, e cobertas com 1µL da solução matriz, composta por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico saturado em solução de acetronila 50% e ácido trifluoracético 2.5%. Após a secagem em temperatura ambiente, foi realizada

a análise e identificação das amostras através do método MALDI-TOF. A análise foi realizada em um espectômetro de massa UltrafleXtreme MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Germany), operando no modo linear e no modo *reflectron*, modo íon positivo (dependendo da faixa de massa). Os espectros de massa foram adquiridos numa gama de massa de 600 a 5000 Da (modo de *reflectron*) e de 5 a 30 KDa (modo linear) com íons formados por irradiação de feixe inteligente utilizando uma frequência de 2.000 Hz, 100 PIE, lente 7kV. A voltagem para a primeira e segunda fontes de íons foi de 25kV e 23kV, respectivamente.

4.6 Avaliação da resposta imune humoral de camundongos imunizados.

4.6.1 Imunização dos animais.

Os ensaios iniciais de imunização foram realizados com grupos de 5 camundongos Balb/c que receberam três doses quinzenais de STag nativo ou irradiados a 250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy por via subcutânea (10µg/0,1mL/animal), diluídos em salina tamponada com fosfato estéril (PBS 1x).

4.6.2 Avaliação quantitativa da eficiência na resposta humoral induzida pela imunização de camundongos Bab/c com STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy e a diferença entre a resposta imune humoral induzida com a imunização por STag ou taquizoítos da cepa RH irradiados a 255Gy.

Para avaliar os efeitos da radiação sobre a massa de proteína usada e a diferença na produção de anticorpos entre as imunizações com STag e taquizoítos íntegros irradiados, grupos de 5 camundongos Balb/c receberam três doses quinzenais com massas de 2, 6, 10 e 20µg-0,1ml/animal, dos STag nativo, STag irradiados e taquizoítos da cepa RH irradiados a 255Gy por via subcutânea, diluídos em PBS 1x estéril. As amostras de taquizoítos irradiados foram adquiridas do estoques existente no laboratório⁶¹.

4.6.3 C57BI/6j (WTC57) e C57Bi/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}).

Após definição das doses utilizadas para os demais estudos os ensaios de imunização passaram a ser realizados em grupos de camundongos *wild type* C57BI/6j (WTCD36^{+/+}) e *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-}(KOCD36^{-/-}). Devido as dificuldades na estabilização das colônias dos animais CD36^{-/-} o número amostral variou de 4-5 animais/grupo, que receberam três doses quinzenais de STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy por via subcutânea (10µg/0.1mL/animal).

4.6.4 Imunização utilizando Albumina de soro bovino (BSA).

O primeiro grupo de camundongos C57Bi/6jCD36^{-/-} imunizados não apresentou produção significante de anticorpos IgG após as imunizações. Com isso

realizamos imunizações utilizando albumina de soro bovino (BSA, diluída em PBS 1x) como uma proteína "controle". Assim, grupos de 5 camundongos WTCD36^{+/+} ou KOCD36^{-/-} foram imunizados com três doses quinzenais por via subcutânea com 10µg (0,1mL/animal) de BSA.

4.6.5 Imunização de camundongos C57Bi/6jCD36^{-/-} com macrófagos peritoneais transplantados de camundongo C57Bi/6jCD36^{+/+} "primados" com STag nativo ou irradiado a 1500Gy.

Macrófagos peritoneais foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos *wild type* C57BI/6j, a partir do inóculo de 5mL de PBS estéril, pH 7,2. As células obtidas foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 2x10⁶ macrófagos/mL. Os macrófagos peritoneais foram transferidos para tubos falcons de 15mL e incubadas sobre agitação, por 1h a 37 °C na presença de STag nativo ou irradiado a 1500Gy. Após, os macrófagos "primados" com STag foram transplantados em animais C57Bi/6jCD36^{-/-} por via subcutânea. Quinze dias após a primeira dose de macrófagos+STag, os animais transplantados receberam mais três doses quinzenais dos STag nativo ou irradiado.

4.7 Obtenção de amostras do soro de animais imunizados.

As amostras de sangue dos animais foram obtidas, por secção leve da extremidade final da cauda dos camundongos imunizados e controle, coletados em papel filtro, estocadas e secas a -20 °C. A eluição foi realizada pela adição de 300µL de tampão contendo Tris/HCI 10mM pH 7,5, NH4CI 150 mM e NaN₃ 10mM para lise de eritrócitos e conversão da hemoglobina para ciano-hemoglobina¹⁴⁸. Após a eluição as amostras foram lidas em espectrofluorímetro Multi-mode Microplate Reader

FilterMAx F5 (Molecular Devices[®], Califórnia, USA) a um comprimento de onda de 540nm para ajuste das diluições (1:100).

4.8 Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos específicos (ELISA).

Para os ensaios de antigenicidade e imunogenicidade, placas de 96 ou 384 poços de poliestireno (Cornig[®]), foram sensibilizadas com antígeno de extrato total de taquizoítos de T. gondii (10ug/mL), suspenso em tampão carbonato de sódio 0.1M pH 9,5, over night a 4° C em câmara úmida. As placas foram lavadas 5 vezes com PBS contendo 0,2% de Tween 20 (PBST) em lavadora de microplacas (Tecan®, Mannedorf, Switzerland), seguidas de bloqueio com PBST, contendo 3% de leite desnatado Molico® (PBSTL), durante 1 hora em estufa a 37º C. Após o bloqueio, amostras de soro de camundongos infectados por diferentes cepas de T. gondii, animais controle (não imunizados) ou o soro de animais imunizados na diluição adequada, foram depositados nas placas, e incubados a 37º C por 1 hora. Após novas lavagens foram aplicados o conjugado anti-IgG de camundongo, em diluição adequada, conjugado a peroxidase (Sigma®, St. Louis, MO, Estados Unidos), com incubação de 1 hora a 37º C. A revelação da reação foi realizada pela adição de TMB (Sure blue Microwell Peroxidase substrate KPL) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCL 4 N. As leituras das densidades ópticas (D.O) foram realizadas em leitor de microplacas Multimode Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices®) no filtro de absorbância de 450nm. Os resultados formam expresso arbitrariamente por índices de reatividade (IR) seguindo a formula mostrada abaixo.

> IR= Abs da amostra (450nm) Média Abs da amostra negativa (450nm)

4.8.1 Porcentagem da avidez de anticorpos IgG.

A avidez dos anticorpos avidez foi realizada da mesma forma como descrito acima, exceto pela adição de solução caotrópica (Uréia 6M, enquanto o restante dos poços foi mantido em PBSTL), após a lavagem da etapa do soro, com período de incubação de 15 minutos a 37 °C. Os valores foram expressos em porcentagem da avidez, obtidos seguindo a fórmula abaixo.

<u>Q=100 – Abs. (450nm) sem uréia x 100</u> Abs.(450nm) com uréia

4.9 Avaliação da resposta imune protetora de animais imunizados - Desafio de camundongos imunizados por via subcutânea com STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy por taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, tipo I virulenta ou cepa ME-49, cistogênica tipo II.

4.9.1 Cepa RH.

Parasitos obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente inoculados e filtrados em membrana de policarbonato de 3,0 µm (ISOPORE[™], Millipore®) para remoção de outros tipos celulares presentes, foram ressuspendidos em solução salina e quantificados em câmara de Neubauer, para ajuste da concentração de parasitos para 10^3 células/mL. Os animais imunizados foram desafiados com 100μ L de salina contendo 10^3 taquizoítos de *T. gondii* viáveis por via intraperitoneal. Um grupo controle de camundongos não imunizados foram inoculados com a mesma quantidade de taquizoítos. A mortalidade foi acompanhada diariamente.

4.9.2 Cepa ME-49.

Animais cronicamente infectados pela cepa ME-49, foram eutanasiados para obtenção dos cérebros que são homogeneizados em solução salina. Em seguida 20µL da suspensão foi verificada por microscopia óptica convencional e camundongos imunizados foram desafiados 15 dias após a última dose de imunização com 10 cistos por via oral. Grupos controles de animais não imunizados foram inoculados com as mesmas quantidades de cistos. A mortalidade foi acompanhada diariamente e após 30 dias, os camundongos foram eutanasiados por narcose com CO₂ e os cérebros homogeneizados em salina (3mL) para quantificação por microscopia óptica.

4.10 Avaliação da resposta imune celular de animais imunizados.

4.10.1 Marcação da superfície celular do sangue periférico de camundongos imunizados.

Células do sangue periférico eram realizadas pela punção cardíaca onde os animais eram sacrificados. Optamos então pela sangria via plexo retro-orbital, isso passou a diminuir o número de grupos necessários para os ensaios imunológicos, já que nessa técnica não há a necessidade do sacrifício dos animais. Células do sangue periférico foram obtidas de camundongos imunizados por via subcutânea com STag nativo ou irradiado a 250Gy, 1500Gy e taquizoítos RH 255Gy e camundongos não imunizados. As células mononucleadas foram separadas por Ficoll-PaqueTM Premium 1084 (GE Healthcare®, Little Chalfont, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Após a separação celular, as células foram ressuspendidas em 1mL de meio de cultura, contadas em câmera de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 2x10⁶ células por mL. Após um período de incubação de 72h na presença de antígeno de extrato total de *T. gondii* (10µg/mL/poço), em estufa a 37°C e CO₂ a 5%, as células foram submetidas à marcação de superfície celular, para fenotipagem das populações celulares. Para a marcação foram utilizados anticorpos monoclonais anti-mouse como: anticorpos anti-CD3 BV421 (BD Biosciences[®]), anti-CD4 BV605 (BD Biosciences[®]), anti-CD8 APC-Cy7 (BDBiosciences[®]); anti-CD44 APC (BD Biosciences[®]); anti-CD45RB FITC (BD Biosciences[®]); anti-CD19 PE-Cy7 (BD Biosciences[®]), anti-CD23 PE (BD Biosciences[®]) e anti-CD27 PerCP-Cy5-5 (BD Biosciences[®]). A mix anticorpos foi preparada em uma diluição de 1:50 em solução ISOTON[®]. 20µL da mix foi adicionada em cada amostra seguida da incubação por 30 minutos à 4°C na ausência de luz. Após o período de incubação as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (LSRFortessa BD Biosciences[®]). A compensação foi realizada com CompBeads[®] *anti-Rato* e *anti-Hamster* (BD Biosciences[®]). Os dados foram coletados em BD FACSDIVA® (BD Biosciences[®]) software e analisados em Flowjo X[®] software.

4.10.2 Estratégia de análise para determinar as populações celulares do sangue periférico de camundongos imunizados com STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e taquizoítos da cepa RH, irradiados à 255Gy por fonte de Co-60.

Para analisar as populações de linfócitos T e B no sangue periférico dos animais previamente imunizados utilizamos a estratégia de analise esquematizada abaixo (Figura 6). As populações celulares foram expressas por porcentagem de células em relação a população do *gate* principal.



- **Figura 6-** Estratégia de análise de linfócitos T e B no sangue periférico de camundongos imunizados com STag nativo ou irradiado e taquizoítos de *T. gondii* irradiados à 255Gy, por via subcutânea. Analise realizada no software FlowJo V10.
- 4.11 Linhagens celulares para obtenção de taquizoítos de *T. gondii* incorporados com prolina-3H tritiada, ou ensaios ligação e captação dos STag nativo ou irradiados.

4.11.1 Cultura de células da linhagem Vero.

Culturas de células vero obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (*ATCC American Type Culture Colection*, Rockville, MD, USA) foram cultivadas e expandidas em garrafas de cultura celular (Cornig® cell culture, New York, USA) em meio DMEM (GibcoTM, Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) à temperatura de 37° C em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após a formação da monocamada celular o meio DMEM foi descartado e as células lavadas pela adição de 20mL de DMEM, em

seguida foram adicionados 15mL de DMEMc e então as células foram "destacadas" pela adição de tripsina versene (Sigma®). As células obtidas foram contadas utilizando contador automático, Scepter 2.0 (Millipore®) para o ajuste da concentração celular. Após a expansão, as células ficam em repouso por 1h e mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ até sua confluência, que ocorria no período de 3 dias.

4.11.2 Macrófagos J774.

Macrófagos J774 (*ATCC - American Type Culture Collection*, Manassa, VA), foram mantidos em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) em atmosfera úmida com 5% CO₂ a 37 °C em garrafas de cultura pequenas (Cornig[®], Nova Iorque, EUA). A cada três dias foram realizadas as trocas de meio e garrafas confluentes foram ampliadas para novas garrafas.

4.11.3 Macrófagos Peritoneais.

Macrófagos peritoneais foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos C57BI/6j e C57B/6jCD36^{-/-} em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e posteriormente aplicados em placas de cultura (Cornig[®]) de maneira estéril. As células foram incubadas por um período de 2 h a 37 °C em atmosfera úmida com CO₂ 5% para adesão à placa. Células não aderentes foram removidas através da lavagem utilizando meio pré-aquecido e posteriormente incubadas nas mesmas condições por um período de aproximadamente 18h.

- 4.12 Obtenção de antígenos solúveis (STags) marcados de forma nãooxidativa para ensaios de ligação e captação em macrófagos.
- 4.12.1 Biotinilação de STag nativo ou irradiado para ensaios de ligação (STag_B).

Para a biotinilação dos STag nativo ou irradiados, utilizamos o agente crossligante "Sulfo-NHSLC-biotin" (Sigma[®]) seguindo o manual de instruções do fabricante. A etapa de incubação em temperatura ambiente foi feita por 1 hora, com homogeneização da solução a cada 20 minutos. Após a etapa de acoplamento covalente da biotina realizamos a purificação por passagem em coluna de exclusão contendo gel SEPHADEX[®] G-10 para eliminação da biotina. Os testes para avaliar o acoplamento da biotina as amostras foram realizadas em fase sólida pela adição das amostras diluídas em diferentes concentrações, em placas de ELISA (Gráfico 1) de 96 poços seguidos do bloqueio, lavagem e adição de avidina conjugada a peroxidase (Sigma[®]) e por *western blot* (Figura 7).


Gráfico 1- Otimização da concentração de STag nativo e irradiados a 250 Gy, 500 Gy, 1000 Gy e 1500 Gy conjugados a biotina e revelados pela adição de avidina conjugada a peroxidase (1:10.000). A- Curva analítica ajustada usando o modelo de regressão linear. R²=STag nativo (0.990), STag 250Gy (0.991), STag 500Gy (0.982), STag 1000Gy (0.977) e STag 1500Gy (0.992). B- Crescimento exponencial da curva mostrando a atividade específica das amostras e a taxa de marcação de biotina em cada produto.



Figura 7- Western blot mostrando o acoplamento covalente de biotina aos STag. 1-STag nativo; 2- STag 250Gy; 3- STag 500Gy, 4- STag 1000Gy; 5- STag 1500Gy. Revelação pela adição de avidina conjugada a peroxidase (1:5.000) e substrato cromógeno TMB.

4.12.2 Marcação biossintética de taquizoítos de *T. gondii* por incorporação de prolina tritiada para obtenção de STag 3-H (STag^{3H}).

4.12.2.1 Infecção das culturas Vero por taquizoítos de cepa RH de T. gondii.

Os parasitos obtidos do exsudato peritoneal de animais previamente inoculados foram filtrados em membrana de policarbonato de 3.0 µm (ISOPORE[™], Millipore[®]) para remocado de outros tipos celulares presentes após o lavado as garrafas de confluência adequada foram infectadas pela adição de 5 taquizoítos por núcleo celular. A cultura infectada foi deixada incubando por 2h para penetração dos parasitos. 2h após o período de incubação adicionamos as culturas o meio DMEM completo contendo SFB a 2% que diminuiu o crescimento celular. No dia seguinte observamos em microscópio invertido os taquizoítos no interior das células. Se a infecção ocorresse de forma adequada todo meio era retirado e então eram adicionados DMEM sem SFB na presença de prolina (L- (2,3-3H) com atividade específica de 2µCi/mL (Amersham International plc/Amersham UK). As amostras então foram incubadas por 3 dias até a destruição total da camada celular pelos parasitos. Os parasitos obtidos foram recuperados a partir da centrifugação da suspensão a 3000 x g por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado de forma segura em recipiente adeguado na sala de radioativos. Os parasitos previamente marcados com prolina 3-H foram sanicados da mesma maneira realizada obtenção do antígeno solúvel, originando para proteínas biossinteticamente marcadas. Após a centrifugação o sobrenadante antigênico foi quantificado no fluorímetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific/Life Technologies) para estabelecer a relação cpm/µg de proteína e as alíquotas mantidas em geladeira até o momento do uso para posterior irradiação.

4.12.3 Marcação das amostras de STag, nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy com fluoresceína isotiocianato (FITC –STag_F).

Alíquotas de FITC foram dissolvidas em solução anidro dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mg/mL. Para cada 1mL de proteína, foram adicionados 50µL da solução de FITC. As amostras foram homogeneizadas e a reação incubada por 8 horas no escuro a 2 °C. Após, foram adicionados 50 mM de cloreto de amônio (NH4CI) e as amostras foram incubadas por mais 2 horas no escuro a 2 °C para neutralização de fluoresceína excedente. A purificação das amostras foi realizada em sistema automatizado LPLC (*Low pressure Liquid Cromatography*), AKTAprime (GE Healtchare[®]), sob o fluxo de 0.5 mL por minuto e frações de 0.5 mL, utilizando como tampão de corrida, solução de borato de sódio a 0.1M, pH7.5. A solução de cada tubo foi recuperada, aplicada em cubatas de UV para leitura em espectrofluorímetro em filtros de absorbância de 280nm e a 485-488nm para determinar a concentração de fluoresceína.



Gráfico 2- Cromatografia de exclusão molecular de amostras de STag conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) em coluna Sephadex G-25-40, sob o fluxo de 0.5 mL por minuto e frações de 0.5 mL. A. STag_F nativo.
B. STag_F 250Gy. C. STag_F 1500Gy. Taxa média molar da quantidade de fluorocromo por proteínas (F/P) = 2.74 mols de FITC por mol de proteína.

4.12.3.1 Cálculo da razão molar fluoresceína x proteína (F/P).

- ✓ E= coeficiente de extinção molar da proteína (ex. para o STag = 30.000 kDa);
- ✓ Amax = Absorbância (A) da solução marcada medida no comprimento de

onda do fluoróforo (480nm);

✓ FC=Fator de correção; ajuste para a absorbância a 280nm;

✓ Fator de diluição.

Concentração de proteína (M) = $\underline{A_{280}}$ - $\underline{A_{480}}$ x FC x fator de diluição E

4.13 Ação das peptidases, tripsina, papaína e pepsina sobre os STag_F nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy.

Com a obtenção de proteínas conjugadas ao FITC, realizamos ensaios de ação proteolítica sobre substrato extratos totais (STag_F). Os substratos foram ajustados para uma concentração de 100μ g/mL. Amostras de STag_F nativo e irradiados foram adicionados em quadruplicatas em placas de 96 poços pretas em H₂0 MilliQ[®]. Em seguida foram adicionadas as peptidases em uma concentração de 5ng/poço. Para cada protease, foram preparados seus respectivos tampões de ativação.

Tabela 1- Peptidases e tampões de ação.

Protease	Tampão	рН
Tripsina	0.046 M Tris HCl, 0.0115 M de Cloreto de cálcio.	8.1
Papaína	1mM EDTA, 0.067mM mercaptoetanol, 5.5mM Cisteina-HCI.	6.0-7.0
Pepsina	0.1M Tris HCl, pH1.0-4.0	1.0-4.0

As amostras de STag_F nativo e irradiados, foram incubadas por 30 minutos a 37°C na presença das proteases e seus respectivos tampões (100µL). Após este período foram adicionados aos poços 100µL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, para precipitação do substrato por 30 minutos em banho de gelo. Para recuperar o precipitado, as placas foram centrifugadas a 2000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e o precipitado das placas ressuspendidos em 100µL

de bicarbonato 5%. Amostras de sobrenadante e precipitado foram lidos a 488 nm em espectrofluorímetro.

- 4.14 Ensaios de ligação e captação dos STag nativo ou irradiado em macrófagos.
- 4.14.1 Ensaios da cinética da ligação dos STag nativo ou irradiado em macrófagos a partir do modelo biotina-avidina (STag_B).

Culturas macrofágicas da linhagem J774 ou macrófagos peritoneais foram cultivados em placas (Cornig[®]) de 96 poços. As células obtidas foram contadas e aiustadas para uma concentração de 2x10⁶ células/poco (em 100µL) em DEMEM contendo 10% de SFB. Após o período de 18h os poços foram cuidadosamente lavados para retirada das células não aderentes e do SFB, pela adição de DEMEM sem soro pré-aquecido a 37 °C. Após as lavagens realizamos o bloqueio pela adição de PBS 1x pré-aquecido contendo BSA 0.1% por 1h a a 37 °C. Os poços foram novamente lavados pela adição de DEMEM pré-aquecido, sem soro, e então foram adicionados aos poços as amostras de STag nativo ou irradiados em uma concentração de 1µg/100µL/poço (octoplicatas). As amostras foram incubadas junto as células por diferentes períodos de tempo (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos). Após, os poços foram novamente lavados e realizamos a fixação das células pela adição de paraformaldeído 1%, durante 10 minutos com posteriores lavagens (5 vezes) com PBS 1x. Após a fixação, foram adicionados aos poços avidina conjugada a peroxidase na diluição de 1:10.000 em PBS1x, e as culturas incubadas por 1 hora a 37 °C. Após novas lavagens a revelação da reação foi realizada pela adição de TMB e interrompida após 30 minutos pela adição de HCL 4 N. As leituras das densidades ópticas (D.O) foram realizadas em leitor de microplacas Multimode Microplate Reader FilterMax FS5 (Molecular Devices[®], Sunnyvale, Califórnia) no filtro de absorbância de 450nm.

4.14.2 Ensaio de ligação e cinética dos STag_F nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em macrófagos J774, por microscopia óptica de fluorescência.

Macrófagos J774 (2x10⁶ células/poco/1mL) foram cultivados em lamínulas de 0,13mm, adicionadas em placas de 24 poços contendo DEMEM mais soro fetal bovino 10% por aproximadamente 18h. Após este período os poços contendo as lamínulas foram cuidadosamente lavados pela adição de DEMEM sem soro, préaquecido e as células incubadas na presença dos STag_F nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy por 0, 15, 30 e 60 minutos (1µg/poço/UAF±1000000). Após este período, os poços foram cuidadosamente levados, e as células fixadas pela adição de paraformaldeído 1% pH 7,5-8,0, durante 10 minutos com posteriores lavagens (5 vezes) com PBS 1x. As células fixadas contendo os STag marcados por fluoresceína (FITC-verde) foram marcadas por um segundo marcador, o Hoechst 33342 (Sigma®azul), conhecido por marcar DNA de células viáveis, por um período de 10 minutos, seguidos de novas lavagens, com PBS 1x. As lamínulas foram cuidadosamente retiradas dos poços e montadas em meio adequados (90% de glicerol, 0,86M Tris/HCl pH8,6 e 0,1% de p-fenilenodiamina como anti-fading, reduzindo a fotodestruição). Após a montagem as lâminas foram observadas em microscópio, Olympus[®] BX-51 com sistema fotográfico Optomics. Para a marcação com FITC, foi utilizado o filtro com emissão de 490nm e excitação de 525nm e para o Hoechst 33342 (Sigma[®]) o filtro de emissão foi de 355nm e o de excitação de 465nm.

4.15 Interferência dos bloqueadores de receptores Scavenger, dextran sulfato ou probucol na ligação dos STag_B nativo ou irradiado em macrófagos.

Para os ensaios de inibição da ligação dos STag_B ou STag_{3H}, culturas de macrófagos obtidas como descrito anteriormente foram mantidas por 30 minutos em banho de gelo. Após este período amostras dos blogueadores (Sigma®) dextran sulfato (0,14µM) e probucol (0,77µM) diluídos em DEMEM, em uma concentração de 0.4µg/100µL/poco foram adicionados aos pocos por um período de 30 minutos a temperatura de 37 °C. Após estes períodos os pocos foram lavados 2 vezes com DMEM pré-aquecido sem soro e então foram adicionadas as amostras de STag nativo ou irradiados em uma concentração de 1µg/100µL/poço. As culturas foram incubadas por 1h a 37 °C. Após, os poços foram novamente lavados e realizamos a fixação das células pela adição de paraformaldeído 1%, durante 10 minutos com posteriores lavagens (5 vezes) com PBS 1x, como descrito acima. Após a fixação, foram adicionados aos poços avidina conjugada a peroxidase na diluição de 1:10.000 em PBS1x, e as culturas incubadas por 1 hora a 37 °C. Após novas lavagens a revelação da reação foi realizada pela adição de TMB e interrompida após 30 minutos pela adição de HCL 4 N. As leituras das densidades ópticas (D.O) foram realizadas em leitor de microplacas Multimode Microplate Reader FilterMax FS5 (Molecular Devices[®]. Sunnvvale. Califórnia) no filtro de absorbância de 450nm.

4.16 Caracterizações imunes e estruturais do receptor *Scavenger* CD36 presentes em macrófagos peritoneais de camundongos *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}).

4.16.1 Histologia.

Órgãos imunes de animais KOCD36^{-/-} (Baço, timo e fígado) foram enviados para análise histológica para posterior verificação por microscopia óptica. As amostras foram processadas na sessão de histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os cortes corados por hematoxilina e eosina foram observados e fotografados em microscópio Olympus[®] BX-50, com sistema fotográfico Optomics (Câmera C-Mos).

4.16.2 Detecção da proteína correspondente ao receptor *Scavenger* CD36 em lisados de macrófagos peritoneais de camundongos WTCD36^{+/+}ou KOCD36^{-/-}.

4.16.2.1 Western blot.

Para detectar a presença da proteína correspondente ao receptor CD36, amostras de macrófagos peritoneais de camundongos *WTCD36*^{+/+} ou *KOCD36*^{-/-} obtidas como descrito no item 4.11.3, foram lisadas por sonicação, 5 ciclos por períodos de 2 minutos em banho de gelo. Após a lise as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante previamente separado por EGPA foi transferido para membranas de nitrocelulose, como descrito em 4.5.3. A reação foi revelada pela adição do anticorpo anti-CD36 (BD Biosciences[®]) conjugado a biotina como descrito em 4.5.3.

4.16.3 Reação em fase sólida para detecção da proteína correspondente ao receptor *Scavenger* CD36 em lisados de macrófagos peritoneais.

Após a quantificação de proteínas presentes no lisado celular, as amostras foram adsorvidas em placas de ELISA de 96 poços. Os lisados foram dissolvidos em tampão carbonato de sódio 0.1 M pH 9.5, *over night* a 4° C em câmara úmida (10µg/mL). As placas foram lavadas 5 vezes com PBS contendo 0.2% de Tween 20 (PBST) em lavadora de microplacas (Tecan®, Mannedorf, Switzerland), seguidas de bloqueio com PBSB, contendo 1% de BSA, durante 1 hora em estufa a 37° C. Após o bloqueio a placa foi lavada novamente e foi adicionado o anticorpo anti-CD36 acoplado a biotina. Após 1 hora de incubação a 37° C a placa foi lavada e foi aplicado a avidina conjugada a peroxidase (Sigma®) seguida de outra incubação de 1 hora a 37° C. A revelação da reação foi realizada pela adição de TMB (Sure blue Microwell Peroxidase substrate KPL) e interrompida após 30 minutos pela adição de HCL 4 N. As leituras das densidades ópticas (D.O) foram realizadas em leitor de microplacas Multimode Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices[®]) no filtro de absorbância de 450nm.

4.17 Ensaio de ligação dos STag^{3H} nativo ou irradiado em macrófagos peritoneais de camundongos *wild type* C57BI/6j ou de camundongos *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-}.

4.17.1 Reconhecimento inicial a frio.

Macrófagos peritoneais obtidos como descrito anteriormente, foram cultivados em de 96 poços em uma concentração de 2x10⁶ células/poço durante 24 horas. Após este período os poços foram lavados com PBS 1x gelado. As placas

foram mantidas em banho de gelo durante todo o processo. As amostras de STag^{3H} nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy foram diluídas para uma concentração de 1µg/mL (0.1mL/poço) em PBS 1x, e então adicionadas aos poços em triplicatas, e incubadas em banho de gelo por 30 minutos. Após, os poços foram lavados pela adição de 300µL de PBS 1x por 3 vezes, e as células desprendidas pela adição de tripsina versene Sigma® (ATV). A contagem de prolina-3H, foi realizada por cintilação líquida, na qual o radionuclídeo é distribuído uniformemente em meio liquido capaz de converter energia cinética das reações nucleares em energia luminosa. Todas as amostras foram contadas 2 vezes por 600 segundos.

4.17.2 Ligação específica.

O ensaio de ligação específica foi realizado seguindo os mesmos passos descritos anteriormente, com a diferença do tempo de incubação dos STag^{3H}, que foram de: 0, 30, 60, 120 e 240 minutos, com o objetivo de avaliar a cinética de processamento de cada antígeno.

4.18 Ensaio de incorporação de STag_F nativo e irradiado a 250 e 1500Gy em macrófagos CD36^{+/+} e CD36^{-/-} por citometria de fluxo.

4.18.1 Tratamento e obtenção de macrófagos peritoneais CD36^{+/+} e CD36^{-/-} para ensaios de citometria.

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos CD36^{+/+} e CD36^{-/-} foram obtidos como descrito em 3.14.2. Após obtenção dos macrófagos as suspensões celulares forma mantida em banho de gelo durante todo o processamento antes dos períodos de incubação. As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 1000

x g por 8 minutos a 20 °C para obtenção do pellet celular. Após os pellets foram ressuspendidos em solução de Cloreto de amônio 0.1M para lise de hemácias e novamente centrifugadas, seguido da lavagem do pellet pela adição de PBS 1x e nova centrifugação. Após as células foram contadas em câmara de Neubauer para o ajuste a uma concentração de 2x10⁶ células/mL. Alíquotas de 2x10⁶ células/mL foram adicionadas em tubos de citometria e incubadas a 37 °C na presença de STag_F nativo e irradiado a 250 Gy e 1500 Gy com. Todos STag foram ajustados para uma concentração de 1µg/mL com UAF de 1x10⁶. As amostras foram incubadas a 37 °C em agitação por 1 hora. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 1000 x g por 8 minutos a 20 °C e lavadas pela adição de 2mL de PBS 1x e novamente centrifugadas. Então, após a fixação com paraformaldeído 4%, realizamos a permeabilização das células pela adição de solução contendo Triton X-100 por 10 minutos. Em seguida as células foram novamente centrifugas e lavadas com PBS 1x.

4.18.2 Marcação celular.

Para a marcação celular foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais anti-*mouse*: anti-CD68 APC (Biolegend[®]) e anti-CD36 PE (Biolegend[®]). A mix anticorpos foi preparada em uma diluição de 1:100 em solução ISOTON[®]. 20µL da mix foi adicionada em cada amostra seguida da incubação por 30 minutos à 4°C na ausência de luz. Após o período de incubação as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (LSRFortessa BD Biosciences[®]). A compensação foi realizada com CompBeads[®] *anti-Rato* e *anti-Hamster* (BD Biosciences®). Os dados foram coletados em BD FACSDIVA® (BD Biosciences[®]) software e analisados em Flowjo X[®] software.

4.18.3 Estratégia de análise para determinar as populações de macrófagos peritoneais que incorporaram STag_F nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy.

Para analisar as populações de macrófagos peritoneais que incorporam as amostras de STag_F marcadas com FITC utilizamos a estratégia de analise esquematizada abaixo (Figura 8). As populações celulares foram expressas por porcentagens de células em relação a população do *gate* principal.



Figura 8- Estratégia de análise de população de macrófagos peritoneais que incorporados com STag_F nativo ou irradiados. Análise realizada pelo *Flowing software.*

4.19 Análise Estatística.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 6.0. Foram consideradas significantes as comparações cuja probabilidade de igualdade foi menor que 5% (p<0.05). A comparação entre imunizações, fenotipagem, resistência e proteases foi feita utilizando teste-t e ANOVA para comparações múltiplas e teste Bonferroni aplicado para comparação entre os grupos selecionados. Para padronizações das marcações e ensaios de ligação foram aplicados testes de regressão linear. Para ensaios de sobrevida após o desafio foi aplicado o teste Log-Rank.

5 RESULTADOS DISCUTIDOS

- 5.1 Avaliação dos efeitos estruturais, antigênicos e imunogênicos induzidos em antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii* (STag) irradiados com radiação gama por fonte homogênea de Co-60.
 - a. Efeitos nas estruturas primárias.
 - Modificações do perfil eletrofórético das proteínas dos STags submetidos a diferentes doses de radiação gama por fonte de Co-60;
 - ii. Porcentagem de ação da radiação sobre as proteínas dos STag.
 - b. Efeitos imunológicos
 - Avaliação da ação da radiação sobre as propriedades antigênicas e imunogênicas dos STag irradiados;
 - ii. Comparar a resposta imune humoral e protetora induzida por STag nativo (não irradiado) e STags irradiados.

5.1.2 Efeitos estruturais induzidos em antígenos solúveis de taquizoítos de
 T. gondii (STag) irradiados a 250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy por fonte homogênea de Cobalto-60 (Co-60).

5.1.3 EGPA (Eletroforese em gel de Poliacrilamida).

Amostras de STag foram submetidas a diferentes doses de irradiação com raios-γ por fonte homogênea de Co-60 (250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy). Após a irradiação dos STag, avaliamos o perfil eletroforético das amostras em gel de resolução de 12,5% (Figura 9). No lane 1, apresentamos o perfil eletroforético do STag nativo (não irradiado). O STag 250Gy (lane 2) não apresentou modificações em seu perfil eletroforético quando comparado a amostra de STag nativo (não irradiado). A partir da dose de 500 Gy (lane 3) observamos a presença de um arraste em proteínas de alto peso que ficou mais evidente com o aumento das doses. Amostras irradiadas a 1000Gy (lane 4) e 1500Gy (lane 5) evidenciam ainda mais o arraste sugerindo quebras e possíveis junções de alguns epítopos. Na figura 7B, mostramos proteínas estruturais importantes presentes no STag nativo (Lane 1) que foram preservadas após a irradiação dos extratos, tais como SAG1 (31 kDa); GRA6 (32kDa); ROP (35 kDa, 38 kDa, 42 kDa e 95 kDa) e GRA2 (34 kDa).



Figura 9- EGPA (12,5%) dos STag nativo e irradiados a diferentes doses de radiação-γ por fonte de Co-60. A- Lane 1- STag nativo; Lane 2- STag 250Gy; Lane 3- STag 500Gy; Lane 4- Stag 1000Gy. Lane 5- STag 1500Gy. B- STag nativo.

5.1.4 Densitometria das bandas dos STag nativo e irradiados a 250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy.

A caracterização estrutural dos extratos por EGPA nos forneceu uma avaliação qualitativa das proteínas dos STag nativo e irradiados. Com o uso do software ImageJ®, realizamos a quantificação relativa das modificações induzidas nos extratos após a irradiação, representada pela área da corrida de cada extrato (Figura 10). Apresentamos a seguir, o perfil da área de corrida do STag nativo (linha verde) em comparação ao perfil das amostras irradiadas a 250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy (magenta). Como observado por EGPA, o STag nativo e o STag 250Gy (Figura 10A) não apresentam diferenças significantes, exceto pelo discreto

alargamento da área de corrida correspondentes a proteínas de massa molecular mais altas no STag 250Gy. Na figura 8B, apresentamos a comparação entre STag nativo e STag 500Gy. Observa-se uma diminuição na altura dos picos e uma aparente junção de áreas. Essa modificação fica mais evidente no perfil de área dos STag irradiados a 1000 Gy e 1500Gy (Figuras 10C e 10D). Doses mais altas de irradiação apresentaram um aumento no fundo de detecção, representada pelo alargamento dos picos, sugerindo quebras e o aparecimento de picos não observados no STag nativo.



Figura 10- Densitometria da área de corrida das amostras de STag nativo e irradiados detectadas no EGPA por software ImageJ. A- STag nativo x STag 250Gy; B- STag nativo x STag 500Gy; C- STag nativo x STag 1000; D- STag nativo x STag 1500Gy. STag nativo (verde); STag irradiados (magenta).

O uso do software Image Lab 6.0.1 (BIO-RAD[®]) possibilitou a identificação estimada da massa molecular de cada banda detectada no gel. Assim, avaliamos o a diferença (r²) entre as bandas presentes no STag nativo e irradiados (Gráfico 3). Os pontos fora da reta sugerem que a radiação gama agiu em proteínas de alta massa molecular, enquanto as de menor massa, pareceram não sofrer modificações

mantendo-se semelhantes entre todos STag analisados. A ação sobre as proteínas de massa molecular mais alta modificou a inclinação da reta de correlação, mostrando que a radiação tem um efeito dose resposta sobre as proteínas de alta massa molecular.



Gráfico 3- Regressão linear mostrando a diferença (r^2) entre as bandas do STag nativo e irradiados identificadas no EGPA pelo software Image Lab 6.0.1 (BIO-RAD[®]): STag nativo x STag 250Gy r² = 0.9943; STag nativo x STag 500Gy r² = 0.9886; STag nativo x STag 1000Gy r² = 0.9842; STag nativo x STag 1500Gy r² = 0.9602).

A partir da média do valor das bandas detectadas nos STag, calculamos a porcentagem da integridade das proteínas dos STag após serem submetidos a irradiação (Gráfico 4). A irradiação agiu em 39% das proteínas do STag 250Gy, 58% das proteínas do STag 500Gy, 60% das proteínas do STag 1000Gy e 70% das proteínas do STag 1500Gy.



Gráfico 4- Porcentagem (%) da integridade das proteínas dos STag irradiados a 250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy por fonte de Co-60. Linha pontilhada mostra a média das proteínas detectadas no STag nativo (não irradiado).

5.1.5 MALDI-TOF – Espectrometria de massa dos STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy.

As amostras de STag nativo (Figura 10A), STag 250Gy (Figura 10B) e STag 1500Gy (Figura 10C) foram submetidas a análise de espectrometria de massa e MALDI-TOF em sua forma liquida pós-irradiação (Figura 11). Houve uma discreta diferença na massa molecular em alguns picos quando comparamos a análise de STag nativo (Figura 11A) e STag 250Gy (Figura 11B). Já a análise da massa do STag 1500Gy (Figura 11C) apresentou maiores modificações caracterizadas pelo aparecimento de picos não detectados no STag nativo e STag 250Gy. Também foi possível observar que alguns picos diminuíram sua participação relativa no perfil, o que pode sugerir a presença de fragmentações ou comprometimento de algumas





Figura 11- Espectrometria de massa (MALDI-TOF) das proteínas dos STag: Anativo; B- STag 250Gy; C-STag 1500Gy.

Com base nos dados apresentados podemos afirmar que a radiação ionizante pouco afetou as proteínas dos extratos antigênicos. O EGPA mostrou que a dose de 250 Gy não afeta significantemente o perfil de proteínas do STag, mas a partir da dose de 500Gy e mais evidente em doses maiores, 1000Gy e 1500Gy, notamos o aparecimento de um arraste em proteínas massa molecular mais alta. Esse efeito foi semelhante aos encontrados em albumina bovina irradiada, aonde os autores descrevem que doses mais elevadas de irradiação podem causar modificações significativas na estrutura das proteínas¹⁴⁹. Em trabalho realizado por nosso grupo, mostramos que doses superiores a 1500Gy induziram maior degradação das proteínas do STag¹⁵⁰. Por densitometria, foi possível confirmar que com o aumento da dose de irradiação, ocorrem discretas modificações no perfil de área das proteínas em relação ao controle de STag nativo (não irradiado). Essas modificações foram caracterizadas pelo aumento do fundo de área da corrida e alargamento dos picos,

fato já observado em venenos irradiados¹⁵¹. Ainda a partir da densitometria, realizamos uma abordagem de quantificação da integridade individual das proteínas. Os resultados demonstrados por EGPA mostraram que há manutenção da integridade geral das proteínas e que estas podem ser quantificadas adequadamente, apesar das discretas modificações individuais.

A espectrometria de massa (MALDI-TOF) das amostras de STag nativo e STag irradiados a 250 Gy e 1500 Gy, mostra que os efeitos anteriormente citados puderam ser confirmados por uma abordagem diferente. A técnica de MALDI-TOF intervém minimamente sobre a molécula¹⁵², diferentemente do tratamento das proteínas para os ensaios de EGPA, e confirmou a manutenção relativa da integridade dos antígenos. Essas alterações podem estar relacionadas ao fato de que amostras irradiadas em solução aquosa sofrem com o efeito indireto da radiação¹⁵³. A interação da radiação gama com a água origina espécies reativas como, e⁻_{aq.} O₂, H[•] e OH[•], estas moléculas são associadas a modificações na proteína como, *cross-linking*, fragmentação, agregação e oxidação¹⁵⁴. Fica claro que há a necessidade de se refinar os protocolos de caracterização dos extratos totais irradiados por MALDI-TOF, para futuramente ser possível concluir se, pequenas moléculas como radicais hidroxila possam ter se incorporado a proteínas aceptoras. 5.1.6 Efeitos antigênicos e imunogênicos induzidos em antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii (*STag) irradiados a 250Gy, 500Gy, 1000Gy e 1500Gy por fonte homogênea de Cobalto-60 (Co-60).

5.1.7 *Western Blot* – Avaliação da antigenicidade.

Após avaliar o efeito da radiação sobre as propriedades estruturais primárias das proteínas dos extratos, as amostras separadas no EGPA foram transferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas pela adição de anticorpos específicos IgG anti-*T. gondii*, presentes no soro de camundongos infectados pela cepa ME-49. Na figura 12, mostramos o perfil de reconhecimento destes anticorpos específicos às proteínas do STag submetidas a diferentes doses de radiação gama. O reconhecimento dos anticorpos específicos foi semelhante em todos os STags estudados. Não houve diferença de reatividade entre STag nativo (lane 1) ou irradiados a 250Gy (lane 2) e 500Gy (lane 3). Mesmo em doses mais altas, 1000Gy e 1500Gy (lanes 4 e 5), houve manutenção das características antigênicas, com algumas modificações, sugerindo uma possível junção de alguns antígenos, assim como a perda de intensidade no reconhecimento de bandas com massa entre 32 e 35 KDa. Na figura 10B indicamos a partir do lane 1, contendo STag nativo, proteínas estruturais antigênicas preservadas após a irradiação.



Figura 12- Perfil do reconhecimento de anticorpos IgG específicos presentes no soro de camundongos infectado pela cepa ME-49 de *T. gondii* (Diluição 1:100) às proteínas de STag nativo e irradiado por *Western blot.* A. 1. STag nativo; 2. STag 250Gy; 3. STag 500Gy; 4. Stag 1000 Gy. 5. STag 1500Gy. B. Lane STag nativo, setas indicam proteínas estruturais preservadas.

5.1.8 ELISA – Avaliação da imunogenicidade.

Para avaliar a imunogenicidade, grupos de 05 camundongos Balb/c foram imunizados por via subcutânea (10µg, 0,1mL/animal) com três doses quinzenais dos STag nativo ou irradiados a 250Gy, 500Gy e 1500Gy. O gráfico 5, mostra a produção de anticorpos séricos IgG anti-*T. gondii* por ELISA, 15 dias após a última imunização. Todas as imunizações induziram a produção anticorpos específicos. Quando comparamos a produção de anticorpos entre os grupos estudados, não houve diferença significativa no título de anticorpos entre as imunizações com STag nativo e STag irradiados a 250Gy e 500Gy. O grupo imunizado com STag irradiado a

1500Gy apresentou maiores níveis de anticorpos IgG específicos quando comparado aos grupos imunizados com STag nativo e irradiados a 250Gy e 500Gy (p<0.05).



Gráfico 5 - Comparação da produção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* no soro de camundongos Balb/c imunizados por via subcutânea com três doses quinzenais de STag nativo ou STag irradiado a 250Gy, 500Gy e 1500Gy, detectados por ELISA. Linha tracejada representa a produção basal de IgG. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (**, *** = p<0.05).</p>

As mesmas amostras foram ensaiadas para detecção da porcentagem de avidez de anticorpos IgG por ELISA com lavagem do poço após reação do soro com agente caotrópico ureia (6M) e no gráfico 6, vemos a porcentagem da avidez de anticorpos IgG após as três imunizações. Não observamos diferença significante entre a maturação de anticorpos dos grupos imunizados com STag nativo e irradiados a 250Gy e 500Gy. A imunização com STag irradiado a 1500Gy induziu maiores níveis de maturação de anticorpos que o STag nativo e os STag irradiados a 250Gy e 500Gy.



Gráfico 6 – Comparação da porcentagem (%) de avidez de anticorpos IgG no soro de camundongos Balb/c imunizados por via subcutânea com 3 dosese STag nativo ou STag irradiados a 250Gy, 500Gy e 1500Gy detectados por ELISA. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (**= p<0.05; ****=p<0.0001).</p>

Com base nos resultados apresentados mostramos claramente a antigenicidade e imunogenicidade específica do STag irradiados, abrindo a possibilidade do uso de extratos antigênicos como imunógeno vacinal eficiente na indução de anticorpos específicos para toxoplasmose. A radiação ionizante foi descrita como ferramenta eficiente na eliminação da toxicidade de venenos com manutenção de suas características antigênicas e imunogênicas¹⁵⁵. Estudos com irradiação de ovalbumina mostraram mudança na antigenicidade apenas com doses superiores a 1000Gy¹⁵⁶, assim como a antigenicidade (resposta imune de IgG) e alergenicidade (resposta imune de IgE) de ovomucóide irradiada a 10 KGy¹⁵⁷. O STag irradiado na dose de 1500Gy, foi mais eficiente na indução da resposta humoral, com maiores concentrações de anticorpos específicos e de alta avidez. Resultados semelhantes foram demonstrados após a irradiação de crotoxina.

Venenos geralmente são epítopos pouco imunogênicos e após serem irradiados se mostraram mais imunogênicos que a forma nativa¹⁵⁸. Este aprimoramento da imunogenicidade foi relacionado pelos autores com a formação de agregados¹⁵¹.

A radiação ionizante oxida as proteínas a partir de radicais oriundos da radiólise da água¹⁵⁵, o que seria semelhante ao tipo de oxidação causada pela mieloperoxidase extracelular liberada por neutrófilos em tecidos com inflamação aguda⁹⁶. Esse processo seria equivalente à ação de alguns adjuvantes, como o completo de Freund's, que geram inflamação local atraindo neutrófilos ao local de imunização⁸⁹. Nossos dados mostram que as modificações da radiação sobre as proteínas as direcionam para um processamento por células imunes mais eficiente, de acordo com os dados observados de maior avidez de anticorpos induzindo imunidade celular adaptativa mais intensa e eficiente, já que a avidez de anticorpos depende da seleção de células mais específicas no centro germinativo¹⁵⁹. A ação dos radicais livres pode ser reconhecida por macrófagos residentes via receptores especializados do tipo Scavenger de vários tipos e responsáveis por captação e processamento de antígenos ambientais⁸¹. Estes receptores também estão presentes em células apresentadoras de antígenos, um grupo celular responsável pela primeira sinapse imunológica da resposta imune adaptativa¹⁴². Estudos anteriores. utilizando crotoxina irradiada demonstraram sua captação e processamento preferencial por macrófagos. Essa captação foi parcialmente bloqueada por bloqueadores de receptores Scavenger para produtos oxidados (probucol) ou para produtos negativamente carregados (dextran sulfato)¹⁴³.

- 5.2 Definição da massa de proteína efetiva para ensaios de imunização e comparação da resposta imune humoral, celular e protetora induzida por STag nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy comparados a taquizoítos íntegros de *T. gondii* irradiados a 255Gy (RH 255Gy).
 - Avaliação da massa efetiva de proteínas dos STag, necessária para induzir a produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* semelhantes aos produzidos pela imunização com taquizoítos RH íntegros irradiados;
 - Avaliação da proteção induzida em animais imunizados com STag nativo ou irradiado e taquizoítos RH íntegros irradiados e desafiados com a cepa RH viável;
 - c. Diferença do perfil celular induzido pela imunização com STag nativo ou irradiado e taquizoítos RH íntegros irradiados. da resposta imune celular induzida após a imunização com STag.

5.2.1 Avaliação quantitativa da eficiência na resposta humoral induzida pela imunização de camundongos Balb/c com STag nativo e irradiado a STag 250Gy e STag 1500Gy comparados a taquizoítos íntegros da cepa RH de *T. gondii irradiados* a 255Gy.

Para compararmos a eficiência de diferentes massas de proteínas dos STag nativo e irradiados e taquizoítos de T. gondii íntegros irradiados a 255Gy (RH 255Gy), imunizamos grupos de 05 camundongos Balb/c com três doses quinzenais de diferentes massas (2µg, 6µg, 10µg e 20µg/ animal) de STag nativo ou irradiado a 250Gy e 1500Gy, comparados a 10⁷ taquizoítos íntegros irradiados a 255Gy O gráfico 7A, apresenta a produção de anticorpos IgG anti-T. gondii detectados no soro de animais imunizados com 2µg de STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e RH 255Gy. Nesse tipo de imunização, houve baixa produção de anticorpos IgG específicos. O grupo imunizado com STag 250Gy apresentou maior concentração de IgG específica que os grupos imunizados STag nativo, STag 1500Gy e RH 255Gy (p<0.05). O gráfico 7B, apresenta a produção de anticorpos IgG anti-T. gondii detectados no soro de animais imunizados com 6µg de STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e RH 255Gy. Com o aumento da massa de proteína, a produção de anticorpos foi maior, mas a produção de IgG anti-T. gondii nas imunizações com STag 1500Gy foi mais elevada em comparação aos demais grupos analisados (p<0.0001), com diferenças menores entre outros antígenos (STag nativo vs STag 250Gy, p<0.05). No gráfico 7C, apresentamos a produção de anticorpos IgG anti-T. gondii detectados no soro de animais imunizados com massa de 10µg de imunógenos. Podemos observar que nesta concentração a produção de anticorpos IgG anti-T. gondii foi mais intensa em todos os grupos analisados. O grupo com maiores índices de anticorpos IgG anti-T. gondii foi imunizado com STag 1500Gy. STag nativo induziu maiores índices de anticorpos IgG específicos que o grupo

imunizado com 10⁷ RH 255Gy (p<0.05). Maiores concentrações de anticorpos IgG específicos ocorreram com STag 250Gy e STag 1500Gy em comparação ao grupo imunizado com 10⁷ RH 255Gy (p<0.05). No gráfico 7D, mostramos a produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii detectados* no soro de animais imunizados com 20µg de imunógenos. Esta massa de proteína não só não induziu maiores concentrações de anticorpos IgG específicos nos grupos imunizados, como houve queda nos índices de anticorpos, apesar de manter-se o perfil de maiores índices de anticorpos com STag irradiados a 250 e 1500Gy, sempre mais elevados que o induzido por taquizoítos íntegros (p<0.005). O STag nativo induziu maiores índices de anticorpos que o observado no grupo imunizado com RH 255Gy.



Gráfico 7- Comparação entre a produção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii no* soro de camundongos Balb/c imunizados com 3 doses quinzenais de STag nativo ou STag 250Gy, STag 1500Gy e RH 255Gy com diferentes massas de proteína, detectados por ELISA. A- 2μg; B-6μg; C- 10μg; D- 20μg. Linha tracejada representa a produção basal de IgG. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (*=p<0.01; **=p<0.05; ***, ****=p<0.0001).

As mesmas amostras foram ensaiadas para detecção da avidez de anticorpos utilizando ureia 6M como agente caotrópico, (Gráfico 8). O gráfico 8A, mostra a porcentagem de avidez de IgG induzida pela imunização de camundongos com massas de 2µg de imunógenos, que foi baixa (<40%) em todos, indicando pouca maturação de anticorpos. Os grupos imunizados com massa de 6µg de imunógenos (Gráfico 8B), mostraram uma avidez intermediária, enquanto a imunização com 10µg (Gráfico 8C) induziu anticorpos de alta avidez (≥40%) em todos os imunógenos, exceto em RH 255Gy. Quando analisamos a avidez dos anticorpos induzidos pela imunização com 20µg de STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e RH 255Gy, observamos menor avidez que com a massa anterior de imunização, embora maior no grupo imunizado com STag 1500 Gy (Gráfico 8D).



Gráfico 8 – Detecção da porcentagem (%) de avidez de anticorpos IgG no soro de camundongos Balb/c detectados por ELISA após a imunização com 3 doses quinzenais por via subcutâneas de STag nativo ou STag 250Gy, STag 1500Gy e RH 255Gy com diferentes massas de proteína. A- 2μg; B- 6μg; C- 10μg; D- 20μg. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asterisco representam a diferença significativa entre os grupos (*=p<0.01; **=p<0.05; ***, ****=p<0.0001).

Este tipo de ensaio demonstrou que mesmo guantidades menores de antígenos podem induzir a formação de anticorpos, embora insuficientes para induzir avidez dos mesmos. É evidente que a resposta humoral induzida por RH 255Gy é bastante diferente da induzida por vacinas de componentes como a STag, com ausência de maturação de avidez independente da massa utilizada. Baseado nos resultados, confirmamos que o STag irradiado a 1500Gy foi o imunógeno mais eficiente na inducão da resposta imune humoral, guando utilizamos a concentração de 10µg/animal, com maiores índices de anticorpos específicos anti-T. gondii e maior maturação de anticorpos em comparação aos outros antígenos. Em relação a dose de radiação, demonstramos que extratos antigênicos necessitaram de doses mais altas de radiação para obter a mesma resposta observada pela imunização com taquizoítos íntegros irradiados, que apresentou resultados semelhantes ao STag 250Gy. Este resultado supõe que há uma semelhança para a produção de anticorpos entre estes dois imunógenos, que necessita da mesma dose de radiação, o que poderia mostrar que a radiação estaria afetando as proteínas dos taquizoítos íntegros, e esta seria a responsável pela imunização e proteção relatada na literatura^{60,61}.

Como em todo imunógeno vacinal, baixas concentrações não são capazes de desencadear uma boa resposta imune, e doses muito altas podem induzir distúrbios no sistema imune¹⁶⁰, como encontramos em nossos modelos. Nossos dados mostram que a resposta imune obtida parece depender de uma dose ideal e não está vinculada ao excesso de massa do imunógeno, uma vez que alcançamos melhor resposta imune utilizando 10µg/animal, e a imunização com 20µg/animal foi menos eficiente na indução e maturação de anticorpos específicos. Este fenômeno de dose maior menos eficiente, pode ser explicado pela indução do fenômeno de tolerância imunológica, associada a um excesso de antígeno em relação ao número de células responsivas ou a indução de célula T reguladoras (Treg)¹⁶¹ ou destruição

de células B¹⁶². Como revisão, o reconhecimento de um antígeno pelo receptor de células T é a primeira etapa para se iniciar a resposta de células T¹⁶³. Durante infecções, células T CD4 discriminam a afinidade do antígeno e a dose, resultando em células efetoras e seleção e amplificação de células de memória. Células B de memória tem receptores específicos que permitem sua ativação semelhante a primária na presença dos antígenos, induzindo uma resposta secundária ativa amplificada¹⁶⁴. A afinidade de um antígeno pelo seu receptor na célula imune tem papel essencial na diferenciação de células T e B. Como o número destas células específicas é limitado, isto não está relacionada a altas doses de antígeno¹¹¹.

5.2.2 Proteção induzida em camundongos Balb/c imunizados com diferentes massas de STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e RH 255Gy e desafiados com 10³ taquizoítos viáveis da cepa RH virulenta de *T. gondii*.

Os grupos imunizados com diferentes massas e antígenos foram desafiados com 10³ taquizoítos viáveis da cepa RH de *T. gondii*, 30 dias após a última dose vacinal, para avaliação da resposta protetora induzida após as imunizações. No Gráfico 9, apresentamos a sobrevida induzida em camundongos onde independente da massa de proteína usada, todas as imunizações foram capazes de aumentar a sobrevida dos animais em comparação ao grupo controle não imunizado, que sobreviveu por três dias pós-desafio. O gráfico 9A, mostra a sobrevida dos grupos imunizados com 2µg de imunógeno, onde os grupos imunizados com STag nativo, STag 250 Gy e RH 255 Gy sobreviveram por 5 dias após o desafio, com uma discreta e insignificante proteção maior por 7 dias em imunizados com STag 1500 Gy. Os grupos imunizados com 6µg de imunógeno, apresentado no gráfico 9B, mostraram sobrevida de 6 dias em STag nativo, menor que 10-11 dias observado em animais

imunizados com STag 250Gy, 1500 Gy e RH 255Gy. Nos animais imunizados com 10µg de imunógeno, notamos maior aumento na sobrevida dos animais imunizados em comparação a demais massas de proteína estudadas (Gráfico 9C), semelhante aos imunizados com 20µg de imunógeno. Nesses grupos, a imunização com STag nativo aumentou para seis dias a sobrevida, enquanto que os grupos imunizados com STag 250 Gy e RH 255 Gy sobreviveram por 12 dias. A sobrevida do grupo imunizado com STag 1500 Gy foi maior de 14 dias após o desafio. Alguns grupos apresentaram animais (1 animal/grupo) que sobreviveram por mais de 20 dias após o desafio.



Gráfico 9- Porcentagem (%) da sobrevida de camundongos Balb/c controle (●) e imunizados com diferentes massas de proteínas de STag nativo (■), STag 250Gy (▲), STag 1500Gy (▼) e RH 255Gy (♦) e desafiados com 10³ taquizoítos viáveis da cepa RH virulenta 30 dias após a última dose de imunização. A- 2µg; B- 6µg; C- 10µg; D- 20µg. Asteriscos representam a diferença entre as curvas de sobrevivência entre grupo controle e imunizado pelo teste Log-Rank (Mantel-Cox).

Ensaios de desafio com cepa virulenta são de análise complexa, já que estamos acompanhando dois processos conjuntos, a invasão do parasito na células hospedeira e a doença, definidos anteriormente em modelos vacinais de toxoplasma^{60,150}. Assim, um imunógeno pode ser eficiente para prevenir a infecção induzindo proteção via anticorpos protetores e outros podem ser mais importantes para a prevenção da doença por induzir células CD8⁺, que eliminam as células hospedeiras infectadas e previnem a doença sem interferir na infecção⁴⁴. O modelo de desafio que apresentamos, utiliza a infecção intraperitoneal, o que implica que estamos observando principalmente a inibição da doença, aqui representada como a morte do hospedeiro. Embora o anticorpo possa cooperar para a morte do parasito por induzir sua fagocitose por macrófagos¹⁰⁸, a proteção encontrada descrita na literatura é mais associada a imunidade celular e a produção de células CD8⁺

Ainda assim, a principal conclusão é que todos os imunógenos irradiados induzem proteção se estiverem em dose suficiente, já que a proteção induzida no grupo imunizado com 2µg foi muito baixa e todos os animais morreram. Todas as doses de STag nativo induziram baixa proteção, como usualmente reportado na imunização na ausência de adjuvantes, similar ao encontrado em inúmeros modelos vacinais(Casciotti et al. 2002; Guiton et al. 2009). Usualmente, é reportado que uma resposta imunológica elevada e duradoura com menor concentração de antígeno implica na adição de adjuvantes imunológicos. A maior dificuldade com o uso destes adjuvantes é a toxicidade e os efeitos colaterais, sendo assim há o requisito de se ter um nível aceitável de efeitos^{51,168}. Em nosso modelo, todo o processo foi realizado sem nenhuma adição de adjuvantes ao imunógeno, com níveis satisfatórios de anticorpos específicos e proteção, tanto para os antígenos livres como para os taquizoítos íntegros irradiados. Interessante notar que todos os imunógenos

Da Costa, A., 2019

irradiados ofereceram uma proteção maior, mas sem relação com a quantidade de anticorpo detectado no soro.

Até o momento, os resultados obtidos em vacinas de subcomponentes para toxoplasmose foram pouco promissores devido à baixa imunidade induzida, diferente da infecção natural ou devido a epítopos pouco seletivos¹⁶⁹. Nossa opção pelo uso de extrato total foi bem-sucedida, com proteção satisfatória quando comparado aos estudos utilizando uma ou algumas proteínas recombinantes que se mostram indutoras de menos imunidade, com baixa imunogenicidade e dependência de adjuvantes externos⁸³. A proteção induzida após o desafio dos animais imunizados utilizando a cepa viável RH de T. gondii (virulenta), mostrou que o STag 1500Gy induziu proteção semelhante a proteção induzida por taquizoítos íntegros irradiados, e ambas foram maiores que a proteção induzida em animais imunizados com STag nativo. Modelos cistogênicos permitem uma melhor dissecção da proteção, avaliando contra infecção, com ausência do agente, ou contra a doença, diminuindo o número de agentes no hospedeiro⁸⁶. Em estudo anterior, mostramos que animais imunizados com STag irradiado a 1500Gy e desafiados com a cepa ME-49 (cistogênica) apresentaram proteção eficiente, com diminuição do número de cistos cerebrais, o que é promissor no teste de uma eventual vacina⁶¹. O uso de proteínas em vacinas de subcomponentes apresentam maior facilidade em sua conservação e transporte, enquanto vacina com parasitos íntegros apresentam uma intrínseca problemática de durabilidade após descongelamento tanto usando taquizoítos irradiados ⁵⁰ ou mesmo agentes atenuados usados comercialmente para ovelhas(Booth et al. 1996).
5.2.3 Perfil da resposta imune celular induzida após a imunização de camundongos Balb/c com STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e taquizoítos íntegros da cepa RH de *T. gondii irradiados* a 255Gy.

Para esclarecer a disparidade de correlação entre níveis séricos de anticorpos e a proteção obtida entre STag e taguizoítos íntegros, decidimos analisar as células imunes em grupos de animais imunizados com estes modelos, usando apenas duas doses de radiação 250Gy, para STag e taquizoítos íntegros, e 1500Gy para STag, para permitir a correta comparação entre os imunógenos. A pesquisa de células antígeno-reativas foi feita em linfócitos de sangue periférico de plexo orbital dos grupos imunizados com três doses quinzenais de 10µg dos imunógenos (STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e 10⁷ RH 255Gy), colhidos 30 dias após a última imunização. Após purificação de linfócitos do sangue periférico, estes foram cultivados estimulados com antígeno de T. gondii (10µg/ml) por 72hs, para proliferação de células responsivas. A seguir, a suspensão celular foi marcada com anticorpos de fenótipo CD19⁺ (linfócitos B), e fenótipos CD3⁺ (Linfócitos T totais), CD4⁺ (linfócitos auxiliares ou helper) e CD8⁺ (linfócitos citotóxicos), e submetidos a citometria de fluxo, com controle adequados como detalhado em Métodos. O perfil celular da proporção de células responsivas ao antígeno apresentado no sangue periférico de animais submetidos às imunizações pode ser visto no gráfico 10. Linfócitos de grupo controle não imunizado não apresentaram proliferação significativa ao antígeno de T. gondii (p<0.05), nem de linfócitos B (CD19⁺) ou T auxiliares (CD3⁺CD4⁺,) ou citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) quando comparados aos demais linfócitos de animais imunizados. O gráfico 10A, mostra a porcentagem de linfócitos B (CD19⁺) detectados nos grupos imunizados. Observamos uma proporção de linfócitos B (CD19⁺) de 14% nos animais imunizados com STag nativo, menor que 19% nos imunizados com STag 250 Gy; e ambas menores que a proporção de 24%

nos imunizados com STag 1500 e 23% nos imunizados com RH 255 Gy. No gráfico 10B, mostramos a porcentagem de linfócitos T (CD3⁺CD4⁺) auxiliares detectados nos linfócitos dos grupos imunizados estimulados com antígeno de *T. gondii*. Linfócitos de animais imunizados com STag nativo tinham 7% de linfócitos T (CD3⁺CD4⁺), maior que 4% encontrados nos linfócitos de animais imunizados com STag 250Gy, mas muito inferior aos 23% de linfócitos de animais imunizados com STag 1500Gy. Em linfócitos de animais imunizados com RH 255Gy, havia uma proporção de 10% de células (CD3⁺CD4⁺), discrepante dos modelos imunizados com STag. O gráfico 10C, apresenta a porcentagem de linfócitos T (CD3⁺CD8⁺) onde observamos 10% de linfócitos T (CD3⁺CD8⁺) nos linfócitos de animais imunizados com STag nativo, 13% nos de imunizados com STag 250Gy e 14% nos de imunizados com STag 1500Gy com efeito aparente dose resposta, mas sem significância estatística. Em linfócitos de animais imunizados com RH 255 Gy, havia uma proporção de 28% de células (CD3⁺CD8⁺), maior e discrepante dos modelos imunizados com STag.



Gráfico 10 - Porcentagem (%) de linfócitos B e T presentes no sangue periférico de camundongos Balb/c imunizados com 10µg de STag nativo, STag 250Gy, STag 1500Gy e 10⁷ RH 255Gy por via subcutânea. A-Linfócitos B (CD19⁺); B- Linfócito T CD3⁺CD4⁺; C- Linfócitos T CD3⁺CD8⁺. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (*=p<0.01; **=p<0.05; ***, ****=p<0.0001).

Demonstramos que as imunizações utilizadas induzem uma proporção de linfócitos responsivos ao antígeno de *T. gondii* com diferenças quantitativas e

qualitativas na resposta. Evidentemente, quando o STag é usado na imunização temos uma indução para linfócitos B e CD4⁺ enguanto a imunização com taguizoítos íntegros irradiados privilegia a resposta CD8⁺. Na toxoplasmose, células T CD4⁺ e T CD8⁺ são essenciais no controle da infecção latente²⁸. Linfócitos T CD8⁺ participam na resposta imune do hospedeiro durante a infecção limitando a multiplicação de parasitos intracelulares como o T. gondil⁴², atacando as células infectadas. A resposta por células CD4⁺ e CD8⁺ também induzem a produção de INF-y na infecção intracelular, sendo que esta resposta por células CD4⁺ é essencial para ativação de macrófagos¹⁷¹. Nossos dados mostram pontos importantes dos guais uma vacina destinada para uma infecção de ciclo complexo necessita abordar, que seriam: (a) proteção contra a doença, impedindo a propagação de parasitos intracelulares e (b) proteção contra a infecção, impedindo a invasão de novas células, por anticorpos¹⁷². Nossa imunização com taquizoítos íntegros irradiados induz maior produção de células CD8⁺, relacionada a manutenção do potencial de penetração celular deste imunógeno⁶⁰ e portanto seus derivados intracelulares poderiam ser apresentados via MHC da classe I mais eficientes para as células CD8⁺ e menos para as células CD4⁺ e B. Outro fato que poderia explica a presença de maior proporção de células CD8⁺ em linfócitos de animais imunizados com STag 1500Gy comparadas aos demais imunógenos STag, é a informação de que proteínas alteradas por oxidação (radiação) ou carbonilação tendem a ser apresentadas por células via MHC classe I¹⁰⁹, o que poderia resultar numa resposta associada de linfócitos CD8⁺ e não somente CD4⁺ e B. Esta produção balanceada parece agir no controle contra a infecção, com maiores concentrações de anticorpos e percentagens balanceadas de células CD4⁺ e CD8⁺. Antígenos apresentados para células T CD4⁺ via MHC de classe II podem ser derivados do meio extra ou intracelular da célula hospedeira¹⁷³. Neste contexto, antígenos irradiados parecem ser apresentados e processados por células B e macrófagos e apresentados via MHC de classe II para células T CD4⁺,

que induziria células efetoras e anticorpos que preveniriam a infecção e a doença, fato claramente identificado na imunização com STag 1500Gy. Em nosso modelo de desafio com cepas viáveis não utilizamos o modelo de transmissão oral, um modelo que pode sofre a interferência de anticorpos secretores quer sejam IgA ou IgM. Estudos com imunização de parasitos íntegros irradiados mostraram proteção significante contra a infecção com aumento na produção de IgA específica secretada, o que bloquearia a infecção no hospedeiro¹³³. Essa proteção por IgA também foi descrita em trabalhos com IgA humana, mostrando proteção contra a infecção em células *in vitro*¹⁷⁴. Estes dados confirmam que uma vacina deve contemplar a proteção para ambos os segmentos da imunidade.

Os resultados obtidos tanto pela vacina de taquizoítos íntegros irradiados como com STag irradiado, mostram que independente das vias como cada um parece ser apresentado, a radiação ionizante é uma ferramenta útil no melhoramento de imunógenos. Com o advento da biologia molecular, a literatura demonstra inúmeros trabalhos utilizando proteínas recombinantes na produção de vacina para toxoplasmose. A oferta de antígenos livres solúveis e de baixo massa molecular, ou de epítopos únicos como no caso de vacinas recombinantes talvez não sejam captadas e processadas via receptores endocíticos gerando uma resposta imune mais fraca, geralmente apenas determinada por anticorpos¹⁷⁴. Vacinas produzidas a partir de proteínas encontradas na superfície de taquizoítos de T. gondii, a SAG1, demonstram que poderiam ser protetoras contra a toxoplasmose aguda¹⁷⁵, porém a proteção total contra a doença aguda ou crônica em camundongos só foi obtida pela adição de adjuvantes potentes como o adjuvante completo de Freund's e QuilA⁵². Em nosso modelo, todo o processo foi realizado sem a adição de adjuvantes ao imunógeno, e assim obtivemos resposta imune humoral, celular e protetora tanto nos extratos proteicos quanto nos taquizoítos íntegros irradiados. Nossos dados demonstram que as modificações causadas nas proteínas após a irradiação gama

ionizante conferem uma maior imunogenicidade permitindo que sejam reconhecidas de maneira mais eficiente pela resposta imune, gerando tanto a produção de anticorpos como a de células citotóxicas, sem problemas de conservação ou adjuvantes.

- 5.3 Demonstração da cinética de ligação e processamento dos STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em linhagem macrofágica J774 e avaliação da ação de inibidores de receptores específicos.
 - A partir da obtenção de STags acoplados a diferentes moléculas não oxidativas, passíveis de quantificação em sistemas celulares *in vitro*, avaliar a ligacao e cinética dos STag marcados em macrófagos J774;
 - Avaliar o efeito de bloqueadores de receptores Scavenger, dextran sulfato (SR-A) e probucol (CD36), na ligacao e cinética dos STag marcados em macrófagos J774;
 - c. Observar s distribuição intracelular dos STags acoplados à fluoresceína (FITC) em macrófagos J774;
 - Avaliar se há diferença na suceptibilidade dos STag nativo ou irradiados à acao das peptidases: tripsina, papaína e pepsina.

Para que pudéssemos avaliar o reconhecimento dos STags nativo e irradiados, precisávamos de formas de marcação que permitissem sua quantificação e se possível localização subcelular. O processo de radiação como descrito no capítulo I promove a oxidação das proteínas e portanto processos oxidativos de marcação deveriam ser evitados^{53,54}. Optamos por utilizar precursores radiativos em células infectadas *in vitro* por taquizoítos da cepa RH de *T. gondii,* como descrito em Métodos. Além disso, após a irradiação dos STag, optamos pela adição de biotina ou marcadores fluorescentes, usando produtos precursores comerciais com pontes éster-N-Hidroxisuccinimida (NH-S). A seguir, apresentamos a atividade específica de cada composto na tabela 2.

 Tabela 2 Características e atividade específica dos diferentes métodos de marcação dos STags utilizados posteriormente em ensaios de captação e cinética em macrófagos.

	STag ^{зн}	STag-Biotina	STag-FITC
Marcador	Prolina L-[2,3,4,5- ³ H]	Biotina (<10% de variação entre STags)	Fluoresceína (<10% de variação entre STags)
Método de ligação	Biossíntese por células e posterior irradiação	Reação NHS com aminas no STag nativo ou irradiado	Reação NHS com aminas no STag nativo ou irradiado.
Detecção	Contagens por min (CPMs)	Avidina-peroxidase	Fluorimetria ou microscopia fluorescente.
Atividade específica/µg	11128 cpm	>100 O.D de TMB em 1 h	3200000 UFA ou 2,8 moléculas Fluoresceína/ proteína 30 KDa.

Como pode ser observado na tabela 2, a maior atividade específica foi obtida com os antígenos biotinilados, que tem a adição de biotina em sua molécula e revelação com avidina peroxidase e TMB, um processo muito amplificado. A atividade com a fluoresceína foi muito boa e semelhante. A marcação biosintética foi

a menos eficiente, mas é a que menos altera a molécula original antes da irradicação. A marcação biosintética não adiciona moléculas ao antígeno, portanto é a perfeita marcação para estudos quantitativos de cinética de captação, mas pela sua baixa atividade específica, não permite estudos de inibição de captação ou mesmo de localização subcelular, Para isto os antígenos marcados por via NHS tem mais atividade específica, e embora os antígenos biotinilados também permitam sua identificação subcelular, o sistema de revelação que usa produtos insolúveis de DAB é mais qualitativo que quantitativo, portanto, pela sua alta atividade específica, utilizamos a detecção de antígeno biotinilado fixado no interior de células nos ensaios quantitativos em geral, e usamos o antígeno fluoresceínado para os ensaios de localização subcelular.

5.3.1 Avaliação da diferença na ligação de STag biosinteticamente marcados com 3H-prolina (STag^{3H} nativo e irradiados a STag^{3H} 250Gy e STag^{3H} 1500Gy) em cultura macrofágicas da linhagem J774 (MØJ774).

Demonstramos nos capítulos I e II que antígenos irradiados parecem ser reconhecidos e processados de maneira diferenciada por células apresentadoras de antígeno. Assim, o próximo passo foi avaliar se há diferença da ligação e captação dos STag nativo ou irradiado em células macrofágicas da linhagem J774, que é originária de uma célula apresentadora de antígeno, tem facilidade de cultivo e é originada do mesma espécie animal onde os ensaios de proteção foram realizados^{176,177}. As amostras de STag^{3H} foram adicionadas às células previamente resfriadas em banho de gelo, para diminuir o metabolismo celular, seguidos de incubação a 37° C em estufa de CO₂ como descrito em Métodos. Assim, avaliamos a diferença na ligação dos STag^{3H} nativo e irradiado a 250Gy e 1500Gy incubados por diferentes períodos (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos). A contagem de

radioatividade (cpm) foi obtida por cintilação líquida por duas contagens de 600s. com erro de 2% na medida. No gráfico 11, podemos observar a incorporação dos STag^{3H} nativo e irradiados à camada de células J774. A incorporação do STag^{3H} nativo nos macrófagos J774 foi crescente até 60 minutos, mas notamos decaimento da incorporação, provavelmente associado a proteólise intracelular e liberação de produtos de degradação para o meio de cultura, o que diminui a radioatividade medida na camada celular. O STag^{3H} 250Gy apresentou incorporação similar ao STag^{3H} nativo até 30 minutos, a seguir com uma incorporação mais lenta e crescente. A incorporação dos STag^{3H} 1500Gy nos macrófagos J774 se mostrou mais lenta e crescente em comparação aos STag^{3H} nativo e 250Gy nos primeiros períodos, mas de forma crescente e acumulativa, sugerindo uma diferente via de captação e processamento, captação mais lenta, mas sem processamento posterior. A partir da regressão não linear destes valores foi possível estimar o número de sítios de ligação específica máxima (B_{max}) de cada STag^{3H} na camada celular, que foi de 51,4±4,0 no STag^{3H} nativo, 58,3±4,3 no STag^{3H} 250Gy e 96,14±13,7 no STag^{3H} 1500Gy. Este valor é independente da velocidade de processamento intracelular do antígeno e mostrou que o STag 1500Gy tem mais sítios de ligação na célula (p<0.005).



Gráfico 11- Diferença na incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a STag^{3H} 250Gy STag^{3H} 1500Gy (1µg/poço) em macrófagos J774 em diferentes períodos de exposição (0, 0.5, 1.0, 2.0 e 4 horas). Dados apresentados por contagem de radioatividade (cpm).

A partir da massa de proteína utilizada no ensaio (1µg/poço) e a contagem de radioatividade de cada amostra, calculamos a porcentagem de incorporação de cada STag^{3H} aos macrófagos J774 (Gráfico 12). Houve uma incorporação crescente em massa nos tempos inicias em todos os antígenos, mas os antígenos irradiados apresentaram incorporação de massa crescente nas células a partir de 60 minutos, enquanto que o STag nativo apresentou decaimento da massa de antígeno na camada celular.



- **Gráfico 12-** Proporção da incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a STag^{3H} 250Gy STag^{3H} 1500Gy (1µg/poço) em macrófagos J774 em diferentes períodos de exposição (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos).
- 5.3.2 Capacidade inibitória do bloqueador de Scavenger, Dextran sulfato e Probucol na ligação dos STag^{3H} nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em culturas macrofágicas da linhagem J774.

Os ensaios iniciais de avaliação do efeito do dextran sulfato ou probucol na captação de STag foram feitos utilizando o mesmo antígeno radioativo biossintético em modelos de placas de 96 poços, para permitir um maior número de replicatas. No entanto, apesar de quantitativos, o menor volume de antígeno e consequente menor quantidade de radiação detectável, gerou resultados de difícil quantificação. Apesar disso, para avaliar se há a participação de receptores especializados no processamento de antígenos irradiados, poços contendo macrófagos J774 (2x10⁶ céls/poço) foram previamente incubados na presença dos bloqueadores de receptor *Scavenger* dextran sulfato (0.04µg/100µL poço/0,14 µM) e probucol (0.04µg/100µL

poço/0,77 μM), antes da adição dos STag^{3H} nativo ou irradiados para avaliarmos a captação dos antígenos, como descrito em Métodos. Apresentamos a seguir, os resultados em cpm, da incorporação de STag^{3H} nativo e irradiados em macrófagos J774 incubados na presença ou ausência dos bloqueadores dextran sulfato (Gráfico 13A) e probucol (Gráfico 13B). Na ausência dos bloqueadores o STag^{3H} 1500Gy foi o mais incorporado pelos macrófagos J774 em comparação aos STag^{3H} nativo e STag^{3H} 1500 Gy (p<0.05). O bloqueador dextran sulfato não interferiu na incorporação dos STag^{3H} nativo e STag^{3H} 250 Gy em macrófagos J774. O bloqueador dextran sulfato interferiu significantemente na incorporação do STag^{3H} 1500Gy aos macrófagos J774 em comparação a contagem detectada na ausência do bloqueador (p<0.0001). Assim como observado com o bloqueador dextran sulfato, o STag^{3H} nativo não foi afetado pelo bloqueador probucol (Gráfico 13B). Os STag^{3H} irradiados apresentaram menor incorporação aos macrófagos J774 na presença de probucol (Gráfico 13B), sendo o STag^{3H} 1500 Gy (p<0.05).



Gráfico 13- Ensaio de incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em macrófagos da linhagem J774 na presença ou ausência dos bloqueadores de receptores *Scavenger*. A- Dextran sulfato (0.04μg/100μL poço); B- Probucol (0.04μg/100μL poço). Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam diferença significativa na presença ou ausência dos bloqueadores (**=p<0.05; ****p<0.0001).

A seguir apresentamos a porcentagem de inibição da incorporação dos STag^{3H} nativo ou irradiados em macrófagos na presença dos bloqueadores dextran sulfato (Gráfico 14A) e probucol (Gráfico 14B). O bloqueador dextran sulfato, inibiu 32% da

incorporação do STag^{3H} 1500 Gy. Na presença do bloqueador probucol, observamos inibição de 27% da incorporação do STag^{3H} 250 Gy e 41% da inibição do STag^{3H} 1500 Gy aos macrófagos J774.



Gráfico 14- Porcentagem de inibição da incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em macrófagos da linhagem J774 na presença ou ausência dos bloqueadores de receptores *Scavenger*. A- Dextran sulfato (0.04μg/100μL poço); B- Probucol (0.04μg/100μL poço). Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam diferença significativa na presença ou ausência dos bloqueadores (**=p<0.05; ***=p<0.0001).

A obtenção de um antígeno marcado de forma biosintética não-oxidativa garantiu a veracidade da captação preferencial do antígeno irradiado por células macrofágicas, mas sua baixa sensibilidade interfere nos resultados de uso de inibidores, por sua baixa atividade específica. A difícil definição de qual o limiar inferior detectável deste antígeno, dificulta a quantificação das reações e aumenta a variação das replicatas. Assim, apesar de confirmarmos nossos resultados quantitativos de captação preferencial de antígenos irradiados, este tipo de antígeno apresentou uma atividade específica insuficiente para prosseguimento os estudos com inibidores. Outro problema importante é a forma de mensuração em tubos individuais, com reagentes complexos de biossegurança elevada e sistemas de leitura individual e longa, resultando em pelo menos 24 horas entre o fim do experimento e a primeira quantificação, com 6 horas de trabalho técnico individual de extrema atenção. A experiência com o dextran sulfato foi extensiva e trabalhosa, com dois experimentos demorando quase 3 semanas para produção e análise completa em cada experimento. Com isso padronizamos ensaios de ligação utilizando STag acoplados à biotina.

5.3.3 Diferença na ligação dos STag nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy acoplados a biotina (STag_B) em culturas macrofágicas da linhagem J774.

Com a obtenção de moléculas marcadas pelo acoplamento covalente à biotina, realizamos ensaios com o objetivo de avaliar a diferença na ligação dos extratos nativo e irradiados em células J774 e compararmos os resultados com os obtidos com STag^{3H}. Para tal, células macrofágicas da linhagem J774, foram cultivadas em placas de 96 poços (2x10⁶ células/poço), como descrito em Métodos e incubados na presença dos extratos nativo e irradiados por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos. No gráfico 15, apresentamos a diferença de ligação entre os STag_B nativo e irradiados na camada celular. Apesar da diferença no perfil de cinética de ligação entre

os ensaios com STag^{3H} e STag_B, em ambos foi possível demonstrar uma maior detecção do STag 1500 Gy no final do ensaio com uma cinética diferente dado o tipo de reação enzimática envolvida. É possível observar que o padrão de ligação foi similar ao observado com o uso dos antígenos incorporados a prolina-3H, seguindo o padrão de decaimento do STag_B nativo após certo período e de crescimento linear do STag_B 1500 Gy. Os três antígenos se ligaram de maneira semelhante aos macrófagos J774 até o período de 30 minutos. Após 60 minutos, STag_B nativo alcança seu maior pico e começa a decair em seguida, como já determinado no STag^{3H}. O STag_B 1500 Gy, apresentou um perfil de ligação crescente e com maior ligação aos macrófagos J774 após de incubação. O STag_B 250 Gy, manteve uma resposta híbrida entre os dois como já visto no STag^{3H}.



Gráfico 15- Ligação dos STag_B nativo e irradiados a 250Gy, e 1500Gy (1x10⁶pg/poço) em células macrofágicas da linhagem J774 (2x10⁶ céls/poço) por diferentes períodos (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos). Ensaios realizados em octoplicatas. Barras representam a média e o erro padrão da média.

A partir da normalização, apresentamos no gráfico 16, a porcentagem (%) de ligação dos STag_B nativo ou irradiados aos macrófagos na cinética temporal de associação, o que permitiu a aplicação de uma curva de ligação não linear e a determinação da capacidade máxima de associação (B_{max}), como calculado para a cinética da captação utilizando antígeno radioativo.



Gráfico 16 - Porcentagem de ligação dos STag_B nativo ou irradiados a STag_B 250Gy e STag_B 1500Gy (1x10⁶pg/poço) em células macrofágicas da linhagem J774 (2x10⁶ células/poço) por diferentes períodos (0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos). Ensaios realizados em octoplicatas. Barras representam a média e o erro padrão da média.

Ainda a partir dos valores de B_{max} , foi possível estimar uma regressão não linear (Gráfico 14) com diferença significante entre o padrão da ligação dos STag_B nativo ou irradiados na camada celular com B_{max} de: 0,5271±0,019 para STag_B nativo, 0,8414±0,033 para STag_B 250Gy e 1,466±0,085 para STag_B 1500 Gy (p<0.001). Estes dados de análise da curva se correlacionaram com os dados obtidos com o antígeno radioativo (r²=0.96). Como anteriormente observado, a maior ligação específica aos

macrófagos J774 foi observada com STag_B 1500 Gy em comparação aos STag_B nativo e STag_B 250 Gy (p<0.0001). Utilizando os valores normalizados e a capacidade de ligação, foi possível identificar a quantidade de antígeno ligado por poço ao final de quatro horas de incubação, um dado individual que permite a avaliação da dispersão dos valores de ligação, embora sem levar em conta a cinética da captação de antígeno. Por se tratar de um valor isolado, eventualmente poderia ser utilizado como medida única de captação e, portanto, apresentar um resultado mais simples de ação de um inibidor. Além disso, a padronização do uso da normalização dos valores diminui o efeito exponencial da reação enzimática da avidina-peroxidase e da densidade ótica, que não são lineares como a medida da radiação. Observando as curvas estimadas dos dados normalizados (Gráfico 16), observamos que há uma grande discriminação em pontos isolados com 1 hora de incubação, e que esta incubação não apresenta o decaimento encontrado em alguns STags nativo e 250 Gy, portanto estamos medindo a captação, mas não a degradação do antígeno que poderia estar ocorrendo e poderia interferir na medida da inibição do receptor como exemplo apresentamos no gráfico 16, os valores de captação obtidos no modelo de antígeno biotinilado.



- Gráfico 17- Estimativa da captação dos STag_B nativo ou irradiados a 250Gy, e 1500Gy (1x10⁶pg/poço) em células macrofágicas da linhagem J774 (2x10⁶ células/poço) após 1h de incubação. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam diferença significativa entre STag_B nativo e irradiados (****=p<0.0001).</p>
- 5.3.4 Localização dos STag_F nativo e irradiados em culturas macrofágicas da linhagem J774 (MØJ774) por microscopia óptica em diferentes períodos de tempo (0, 15, 30 e 60 minutos).

Os ensaios de ligação dos STag em MØJ774 mostraram que há diferença em relação ao tempo de processamento dos STag. A partir do acoplamento dos STag nativo e irradiados a fluoresceína (STag_F), incubamos os STag_F por diferentes períodos em culturas de MØJ774 para observar em microscópio óptico qual seria sua localização. Nossos resultados mostram que no tempo 0 (incubação dos STag_F por 3 minutos, seguidos da lavagem e fixação das células), há uma maior intensidade de fluorescência do STag_F irradiado a 1500Gy (Figura 13C-T0) em comparação aos STag_F nativo (Figura 13A-T0) e irradiado a 250 Gy (Figura 13B-T0). Após 15 e 30

minutos, observamos que a intensidade da fluorescência foi similar para os três STag_F avaliados. No período de 60 minutos, notamos que a fluorescência do STag_F nativo (Figura 13A-T60) era praticamente imperceptível e a do STag_F 250Gy (Figura 13B-T60) havia diminuído gradativamente. O perfil observado na microscopia dos MØJ774 junto ao STag_F 1500 Gy (Figura 13C-T60) mostrou que após 60 minutos a intensidade de fluorescência era semelhante as dos tempos iniciais. Este resultado pode sugerir uma maior permanência do STag_F 1500 Gy nas células e confirmam morfologicamente os dados cinéticos quantitativos obtidos.



Figura 13- Microscopia ótica de fluorescência indicando a localização dos STag_{F:}
A- nativo; B- 250Gy; C- 1500Gy em culturas macrofágicas da linhagem J774 por diferentes períodos de incubação (0, 15, 30 e 60 minutos). Verde = STag nativo e irradiados conjugados ao FITC; azul = marcação do núcleo celular pelo corante Hoechst. Aumento de 40x.

5.3.5 Capacidade inibitória de bloqueadores de Scavengers Dextran sulfato e Probucol na ligação dos STag_B nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em culturas macrofágicas da linhagem J774.

Nesta etapa avaliamos a participação de receptores do tipo *Scavenger* no processamento de antígenos irradiados em macrófagos J774 utilizando STags acoplados à biotina. Culturas macrofágicas $(2x10^6 \text{ células/poço/100µl})$ resfriadas (para evitar a internalização das proteínas), foram incubadas na presença de STag_B nativo ou irradiado $(1\mu g/100\mu l/poço)$, após o bloqueio prévio dos receptores, dextran sulfato e probucol ($0.04\mu g/100\mu l/poço$). Podemos observar que a ligação do STag_B nativo aos macrófagos não foi inibida por nenhum dos bloqueadores usados quando comparamos aos poços controle, sem bloqueador (Gráficos 18A). O STag_B 250 Gy foi inibido significantemente (p<0.05) na presença do bloqueador probucol, mas não pelo bloqueador dextran sulfato (Gráfico 18B). O STag_B 1500 Gy foi significantemente (p<0.0001) inibido de se ligar aos macrófagos J774 tanto na presença de dextran sulfato quanto na presença de probucol (Gráfico 18C).



Gráfico 18- Ensaio de ligação dos STag_B nativo ou irradiados em macrófagos linhagem J774 (2x10⁶ células/poço) na ausência ou presença de bloqueadores de receptores *Scavenger* (0.04 μg/100μl). A- STag_B nativo + Dextran sulfato ou Probucol; B- STag_B 250Gy + Dextran sulfato ou Probucol; C- STag_B 1500Gy + Dextran sulfato ou Probucol; Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam diferença significativa na presença ou ausência dos bloqueadores (**=p<0.05; ****=p<0.0001).

A partir dos valores obtidos do ensaio apresentado em absorbância (450nm), ajustamos os valores de cada D.O para constante de ligação de cada STag_B para estimar a porcentagem de inibição de cada bloqueador. O STag_B nativo não sofreu inibição de sua ligação na camada celular independente da concentração ou do bloqueador testado (Gráficos 19A). O bloqueador probucol inibiu 30% da ligação do STag_B 250 Gy aos macrófagos J774 (Gráfico 19B). Na presença do bloqueador dextran sulfato, observamos uma inibição de ligação de 60% das proteínas do STag_B 1500 Gy. A ligação do STag_B 1500 Gy foi ainda mais inibida na presença do bloqueador probucol, que interferiu em 75% da ligação das proteínas aos macrófagos J774 (Gráfico 19C).



Gráfico 19- Porcentagem da inibição (%) dos STag_B nativo ou irradiados em macrófagos linhagem J774(2x10⁶ células/poço) na ausência ou presença de bloqueadores de receptores *Scavenger*. A- STag_B nativo + Dextran sulfato ou Probucol; B- STag_B 250Gy + Dextran sulfato ou Probucol; C- STag_B 1500Gy + Dextran sulfato ou Probucol. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam diferença significativa na presença ou ausência dos bloqueadores (**p<0.05; ****p<0.001).

A partir da conjugação dos STag nativo e irradiados a biotina avaliamos a diferença de ligação dos STag nativo e irradiados em culturas macrofágicas. Para quantificar a diferença da ligação entre os STag nativo ou irradiados em macrófagos, adaptamos um tipo de ensaio *in vitro*, onde macrófagos cultivados em placas de 96 poços foram incubados por diferentes períodos de tempo na presença dos STag_B e posteriormente revelados por conjugados enzimáticos ou STag^{3H} a partir da leitura da radioatividade em contador-beta (cpm). A partir disso demonstramos que a ligação do STag nativo ocorre de forma linear, seguido de decaimento após o aumento do tempo, enquanto o STag irradiado. 1500Gy apresenta uma cinética linear e crescente. Estes resultados nos permitiram sugerir a participação de uma via alternativa na captação dos STag irradiados.

Células apresentadoras de antígenos (APCs) iniciam uma resposta imune adaptativa, a partir da degradação de proteínas intracelulares gerando peptídeos que irão se ligar ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e serão expostos na superfície da APC para o reconhecimento de células T¹⁷⁸. Estas etapas requerem a ação conjunta de moléculas acessórias, dentre elas proteases para degradação destes antígenos. A estabilidade de um antígeno é essencial para uma apresentação eficiente. Tradicionalmente vacinas empregam patógenos atenuados ou mortos e com o advento da biologia molecular, vacinas de proteínas recombinantes, que relevantes¹⁷⁹. carregam somente componentes considerados Proteínas recombinantes, geralmente apresentam imunogenicidade limitada, induzindo uma resposta imune menos robusta tornando necessário o uso de adjuvantes nas formulações¹⁸⁰. A radiação gama ionizante promove a formação de agregados proteicos pouco solúveis⁹⁵, que podem ser comparados a adjuvantes do tipo Alúmen que funcionam como insolubulizadores⁹⁵. Para aumentar imunogenicidade das proteínas presentes em uma vacina, adjuvantes induzem um tipo de inflamação aguda com influxo de neutrófilos ativados⁹⁵. Neutrófilos induzem produtos oxidantes

potentes como o ácido hipocloroso e induzem oxidação de proteínas presentes no local da inflamação⁹⁶. Em estudos utilizando neutrófilos, foi possível observar que a oxidação de proteínas por via endógena em neutrófilos derivados do ácido hipocloroso são capazes de aumentar a imunogenicidade de proteínas que passam a ter a capacidade de se ligar a um classe de receptores endocíticos presentes em APCs¹⁸¹, como receptores Scavenger do tipo A (CD206) e CD36. Este parece ser o efeito principal dos adjuvantes.

Em virtude dos resultados mostrando uma maior ligação do STag_B irradiado decidimos então, utilizar bloqueadores de Scavenger em nosso modelo de "ELISA in cell". Utilizamos o bloqueador dextran sulfato um sal polianiônico conhecido por ser um ligante especifico de Scavenger¹⁸² para ânions e o probucol, um anti-oxidante capaz de se ligar em monócitos impedindo a ligação de proteínas oxidadas em células endoteliais¹⁸³. A partir deste ensaio observamos que a ligação do STag 1500Gy foi mais afetada pelo bloqueador probucol do que pelo dextran sulfato. Nossos ensaios de bloqueio mostraram que a ligação de antígenos irradiados em macrófagos sofreu queda significante na presença de bloqueadores de Scavenger, principalmente probucol. O mesmo perfil foi observado em ensaios utilizando crotoxina irradiada que atribuiu a presença aumentada do produto irradiado em macrófagos a uma menor degradação por peptidases¹⁴³. Estudos utilizando células endoteliais progenitoras mostraram que o probucol foi capaz de reverter os efeitos do LDL-oxidado sobre células mononucleares do sangue sem a produção de espécies reativas de oxigênio pela célula receptora¹⁸⁴, o que sugere que a via de captação de produtos oxidados é diferente e menos rica em peptidases.

5.3.6 Susceptibilidade dos STag_F nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy à ação das peptidases, tripsina, papaína e pepsina.

Por microscopia ótica observamos diferenca na ligação dos STag_Fa camada celular de MØJ774. Uma das etapas do processamento de antígenos é sua fragmentação para peptídeos. A partir da marcação dos STag por isotiocianato de fluoresceína (FITC) e posterior precipitação pela adição de ácido tricloroacético 5% (TCA), avaliamos a susceptibilidade dos STag_F nativo ou irradiados a 250 Gy e 1500 Gy à ação das peptidases, tripsina, papaína e pepsina. Apresentamos os resultados em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF; gráfico 20A) e porcentagem de susceptibilidade dos STag_F as peptidases (Gráfico 20B). Quando comparamos as UAF das amostras de STag_F nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy na presenca ou ausência das peptidases estudadas, houve diferença significante dos produtos insolúveis fluoresceínados detectados (p<0.05), demonstrando a ação de todas as peptidases, em principal da peptidase pepsina, em comparação as amostras controle peptidase). Porém não identificamos diferença estátisca entre a (sem susceptibilidade dos STag_F nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy a ação das peptidases estudadas. A peptidase tripsina, agiu em 17% das proteínas do STag_F nativo, 22% das proteínas do STag_F 250 Gy e em 28% das proteínas do STag_F 1500Gy. Observamos ação da peptidase papaína em 20% das proteínas do STag_F nativo, 23% das proteínas do STag_F 250Gy e em 29% das proteínas do STag_F 1500Gy. A peptidase pepsina agiu em 32% das proteínas dos STag_F nativo e STag_F 250 e em 37% das proteínas do STag_F 1500Gy.



Gráfico 20- Susceptibilidade dos STag_F nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy à ação das peptidases: tripsina, papaína e pepsina, após incubação por 30 minutos a 37 °Cs. A- UAF de produtos insolúveis dos STag_F nativo e irradiados a 250Gy e 1500Gy em TCA 5% B- % de susceptibilidade dos STag_F nativo e irradiados a 250 Gy e 1500Gy à ação das peptidases. Barras representam a média e o erro padrão da média.

A partir da marcação dos STag com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e posterior precipitação utilizando ácido tricloroacético (TCA), foi possível avaliar

diferenca da ação de peptidases sobre os STag_F nativo ou irradiados, pelo aumento da fluorescência pela exposição de fluoróforo a partir da clivagem proteolítica. Observamos que o STag 1500 Gy apresentou a mesma sensibilidade a peptidases que o STag nativo fato que demonstra que não há uma inducão de resistência a peptidases pela ação da radiação nos extratos. Um estudo utilizando toxina tetânica, mostrou que após a eliminação de locais de processamento de asparagina endopeptidases no fragmento C da toxina, tornou o antígeno altamente resistente a proteólise, afetando sua apresentação¹⁸⁵, isto sugere que em extratos antigênicos totais a radiação o modifica de maneira que ao invés de o tornar suscetível a ação proteolítica o mesmo se torna hábil a ser apresentado por diferentes vias. Em APCs as peptidases são responsáveis por gerar fragmentos peptídicos de antígenos proteicos que se ligam em moléculas MHC durante a resposta imune, principalmente as mediadas por linfócitos T¹⁸⁶. Em extratos antigênicos múltiplas enzimas e múltiplos locais de processamento devem ser necessários para liberação dos epítopos¹⁸⁵, mas a susceptibilidade a peptidases dos extratos irradiados mostra que mais do que resistência a proteólise em nosso caso, uma via intracelular diferente pode ter sido utilizada pelos extratos irradiados, ao menos parcialmente e em dose resposta, mostrando que esta via é menos processada e ao mesmo tempo gera peptídeos de tamanho adequado para a sinapse imunológica inicial, que envolve produtos de peso molecular considerável, por exigir a reação a múltiplos receptores espacialmente¹⁸⁷.

Existem diversas vias para internalização de nutrientes em macrófagos, células dendríticas e outras células nucleadas. A maioria dos processos de endocitose envolve a ligação em receptores de membrana como receptores de células B, receptores Fc e receptores *Scavenger*¹⁸⁸. A ligação de um antígeno em um receptor de célula B (BCR) ocorre a partir de diversos eventos de sinalização. Estes incluem a endocitose de complexos ligantes- receptor, via vesículas revestidas de clatrina¹⁸⁹, a partir de lisossomos¹⁹⁰, a partir da degradação de proteínas associadas

a peptídeos e a apresentação de peptídeos às células via MHC-II¹⁹¹. A via utilizada para internalização do antígeno depois da ligação ao receptor depende da conformação do epítopo apresentado e do tipo de receptor envolvido¹⁹². Antígenos mais solúveis frequentemente são internalizados via vesículas que se formam sobre as membranas celulares revestidos por clatrina¹⁹³, assim proteínas mais solúveis e de baixa densidade são transportadas por compartimentos endossômicos de digestão mas sem a participação de receptores, esse processo chamado de micropinocitose¹⁹⁴. Isso explica a resposta imune obtida também pela imunização com proteínas nativas, e a captação que ocorreu tanto das proteínas nativas quanto irradiadas mesmo na presença de bloqueadores específicos. Antígenos que apresentam modificações em seus epítopos, como presença de agregados, crosslinks ou até mesmo uma degradação seletiva, em nosso caso induzidos após a irradiação em solução aquosa, seriam internalizados via receptores e uma internalização via macropinocitose¹⁹⁵. Esta apresenta vias endocíticas que complementam o processo de apresentação de antígenos via receptores como, tolllike receptors (TLR), receptores de reconhecimento padrão (PRR) ou receptores do tipo Scavenger em vesículas contendo MHC¹⁹⁶. Assim acreditamos que neste contexto a irradiação em dose ideal promove a oxidação de proteínas, gerando sua maior captação por macrófagos por receptores de proteínas oxidadas. Esta captação específica simula a oxidação por polimorfonucleares (PMNs) induzida por adjuvantes e promove uma melhor apresentação dos antígenos oxidados por um processamento intracelular diferenciado, vesicular e menos ricos em peptidases, levando a uma perfeita associação dos peptídeos gerados pela digestão parcial às moléculas MHC intravesiculares¹⁸⁹.

5.4 Avaliação da participação do receptor *Scavenger* CD36 no processamento de STag irradiados e imunogenicidade em camundongos *wild type* C57BI/6j (WTCD36^{+/+}) e *knockouts* C57BI/6j CD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}).

Nesta etapa, visamos demonstrar a participação de CD36 na internalização preferencial de STags irradiados por células apresentadoras de antígenos. Iniciamos mostrando o perfil imunológico destes animais, através da histologia de órgãos linfoides, seguida de comprovação da existência de imunoglobulinas séricas e finalmente pela confirmação da ausência do antígeno CD36 em seus macrófagos.

- a. Caracterização dos aspectos imunológicos de animais KOCD36^{-/-}, através da histologia de órgãos linfóides, imunoglobulinas IgG, IgA e IgM séricas e pesquisa de presença de CD36 em macrófagos;
- b. Comparar a cinética e a ligação dos STag nativo ou irradiados em macrófagos peritoneais de animais WTCD36^{+/+} e KOCD36^{-/-}, utilizando STag^{3H} ou STag_F por citometria de fluxo;
- c. Comparação da imunidade humoral e celular induzida em animais
 WTCD36^{+/+} e KOCD36^{-/-}, imunizados com STag nativo ou irradiado a 250
 Gy e 1500 Gy;
- d. Comparação da imunidade protetora induzida por STag nativo ou irradaiado a 250 Gy e 1500 Gy em animais KOCD36^{-/-}, desafiados por duas cepas disitintas de *T. gondii* (cepas RH e ME-49);
- Resposta imune humoral induzida em animais KOCD36^{-/-}, transplantados com macrófagos peritoneais de animais WTCD36^{+/+}, "primados" com STag nativo ou STag irradiado a 1500 Gy.

5.4.1 Análise histológica de baço, timo e fígado de camundongos C57BI/6jCD36^{-/-}.

Ensaios iniciais de imunização e desafio, mostraram que animais KOCD36^{-/-} não produziram anticorpos IgG e foram altamente suscetíveis a infecção por *T. gondii*, em ambas as cepas testadas. Com isso antes de realizarmos novos grupos de imunizações, realizamos a histologia de órgãos imunes como, baço, timo e fígado, com o objetivo de evidenciar diferenças morfológicas significativas. Na figura 14, podemos observar que o baço apresentou morfologia normal, sendo possível observar, cápsula, polpa vermelha com bainhas periarteriais, veias trabeculares típicas e vasos sanguíneos. Na polpa branca mostramos presença do seio marginal revestindo os nódulos linfoides e arteríolas centrais com endotélio alto. A amostra analisada parece apresentar poucos centros germinativos característicos da resposta imune adaptativa, mas é possível observar que a população linfocitária é abundante.



Figura 14- Histologia de baço de camundongo knockout C57Bl/6jCD36^{-/-}; Aumento de 20x. (Coloração por Hematoxilina e Eosina).

O timo também apresentou histologia normal, com presença de células reticulares epiteliais, importantes para a maturação de linfócitos no órgão, embora em pequeno número (Figuras 15Ae 15B), vasos sanguíneos (Figura 15A), trabéculas, medula e córtex (Figuras 15B), com estruturas lembrando corpúsculos de Hassal (Figura 15C).



Figura 15- Histologia de timo de camundongo knockout C57Bl/6jCD36^{-/-}; A e B-Aumento de 20x; C- Aumento de 40x (Coloração por Hematoxilina e Eosina).

Também observamos normalidade na histologia do fígado (Figura 16), mostrando manutenção da estrutura do ácino hepático, distribuição usual de artérias e vasos portais, sistemas biliares e hepatócitos, distribuição usual das células de *Kupffer*, ou seja, presença normal de macrófagos residentes.


Figura 16- Histologia de fígado de camundongo knockout C57Bl/6jCD36^{-/-}; Aumento de 40x. (Coloração por Hematoxilina e Eosina).

5.4.2 Comparação da quantidade de imunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM) em camundongos *wild type* C57BI/6j (WTCD36^{+/+}) e *knockouts* C57BI/6jCd36^{-/-} (KOCD36^{-/-}) por ELISA direto.

Além das análises histológicas, que demonstraram normalidade nos órgãos imunes dos animais KOCD36^{-/-}, realizamos também a determinação da concentração sérica das principais classes de imunoglobulinas, IgG, IgA e IgM, através de um ELISA direto, sensibilizando placas de 96 poços com soro de animais WTCD36^{+/+} ou KOCD36^{-/-} reveladas pela adição de anticorpos anti: IgG, IgA e IgM conjugados a peroxidase, para avaliar a possibilidade da ausência ou menores concentrações de anticorpos nos animais KOCD36^{-/-}. Podemos observar no gráfico 21, que as concentrações de IgG no soro dos animais WTCD36^{+/+} ou KOCD36^{-/-} não

apresentaram diferença significativa, dado confirmado pela eletroforese em gel de agarose (Figura 17). Maiores concentrações de IgA e IgM foram detectados no soro dos animais KOCD36^{-/-} em comparação aos animais WTCD36^{+/+} (p<0.001). Esses dados mostram que a ausência de CD36 não interferiu nos níveis de imunoglobulinas séricas destes animais.



Gráfico 21- Comparação das concentrações de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM detectadas no soro de animais wild type C57BI/6j (WTCD36^{+/+}) e knockouts C57BI/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}) por ELISA direto. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa (***=p<0.05; ****=p<0.0001) entre os grupos analisados. Figura 17- Gel de agarose das proteínas do soro de animais WTCD36^{+/+} (lanes1-4) e KOCD36^{-/-} (Lanes 5-8).

5.4.3 Detecção da proteína correspondente ao receptor Scavenger CD36, em lisado de macrófagos peritoneais de animais wild type C57BI/6JCD36^{+/+} (MØCD36^{+/+}) e de camundongos knockouts C57BI/6JCD36^{-/-} (MØCD36^{-/-}).

5.4.3.1 Western blot.

A obtenção de animais deficientes deste receptor foi um passo importante para avaliarmos a participação de receptores especializados no melhor processamento de produtos irradiados. Para confirmar a ausência do antígeno nos animais, procedemos diferentes abordagens de pesquisa do antígeno CD36 em células ou materiais derivados destes animais. Na primeira abordagem, que usa nossa célula alvo, pesquisamos a presença de CD36 em lisados de macrófagos peritoneais separados por EGPA-SDS e transferidos a membranas de nitrocelulose (Western blot; figura 18). Para isso, conjugamos anticorpo anti-CD36 comercial à biotina, como descrito em Métodos, seguido da reação com a membrana contendo as proteínas dos lisados separadas em diferentes tampões denaturantes. Isto foi feito para aumentar a solução das proteínas de membrana, tentando solubilizar completamente estas estruturas. Detectamos qualitativamente a presença da proteína de aproximadamente 75kDa em lisados de macrófagos MØCD36^{+/+} (lanes 3) e a sua ausência em lisados de macrófagos MØCD36^{-/-} obtidos para nosso estudo (Lanes 4) usando o tampão menos denaturante. O tampão mais denaturante (Lanes 1 e 2) afetou o reconhecimento do anticorpo em todos os ensaios provavelmente por alterar drasticamente a conformação da proteína na denaturação anterior a eletroforese. Este resultado comprova que o efeito de nocaute do gene resultou na inexistência da proteína e não em uma modificação estrutural que a tornasse não funcional, mas reagente ao anticorpo.



Figura 18- Detecção da proteína correspondente ao receptor Scavenger CD36 em MØCD36^{+/+} e MØCD36^{-/-} por Western blot. 1-2 MØCD36^{+/+} tratado com tampão de amostra com e sem uréia. 3-4 Lisado de MØCD36^{+/+} tratado com tampão de amostra com e sem uréia. Seta indica proteína correspondente ao receptor.

A presença da proteína CD36 também foi identificada quantitativamente no lisado utilizando o anticorpo biotinilado. Avaliamos a detecção da proteína correspondente ao receptor a partir da adsorção das proteínas dos lisados celulares em placas de ELISA, seguida de reação com o conjugado especifico e revelação pelo sistema biotina-avidina. Para minimizar as ligações inespecíficas diluímos o anticorpo e o conjugado avidina-peroxidase em soro de camundongos normais, uma vez que o anticorpo utilizado se trata de um isotipo de IgA. Podemos observar diferença (p<0.05) entre a ligação do anti-CD36_B às proteínas dos lisados de MØCD36^{+/+} e MØCD36^{-/-} (Gráfico 22). Houve uma ligação inespecífica do anticorpo ao imunosorvente, provavelmente devido a ligação inespecífica a outros fatores contidos no lisado como receptores FC e proteínas de membrana.



Gráfico 22– Reconhecimento de anti-CD36 conjugado a biotina a proteínas presentes em lisado de macrófagos CD36^{+/+} e macrófagos CD36^{-/-}. Ensaio realizado em triplicatas e revelados pela adição de avidina conjugada a peroxidase (1:10.000). Barras representam o desvio padrão da média.

5.4.4 Diferença na ligação de STag biossinteticamente marcados com prolina tritiada (STag^{3H} nativo ou irradiados a STag^{3H} 250Gy e STag^{3H} 1500Gy) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos *wild type* C57BI/6jCD36^{+/+} (MØCD36^{+/+}) ou *knockouts* C57BI/6JCD36^{-/-} (MØCD36^{-/-}).

5.4.4.1 Reconhecimento inespecífico (Ensaio de ligação à frio).

Como demonstrado anteriormente, a incorporação de aminoácidos radioativos proporcionou a obtenção de um antígeno especifico mais estável. Com a obtenção de camundongos deficientes do receptor *Scavenger* CD36, avaliamos a

diferença da ligação dos STag^{3H} nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos WTCD36^{+/+} ou KOCD36^{-/-}. Como passamos a utilizar macrófagos peritoneais e não mais a linhagem macrofágica J774, realizamos inicialmente um ensaio a frio para tentar observar diferença na ligação dos STag^{3H} aos macrófagos peritoneais e se essa ligação poderia ser associada a ausência do receptor CD36. Para isso realizamos um ensaio mantendo os macrófagos peritoneais resfriados, e após 30 minutos de incubação dos STag^{3H} nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy junto aos macrófagos realizamos as contagens de radioatividade (cpm). No gráfico 23, observamos diferença significativa entre a incorporação dos STag^{3H} nativo ou STag^{3H} 250 Gy e STag^{3H} nativo foi mais incorporado em MØsCD36^{+/+} do que por MØsCD36^{+/+} (p<0.0001), enquanto o STag^{3H} 1500 Gy foi mais incorporado por MØCD36^{+/+} do que por MØCD36^{-/-} (p<0.0001).



Gráfico 23- Ensaio de incorporação a frio dos STag^{3H} nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy em macrófagos peritoneais MØCD36^{+/+} ou MØCD36^{-/-}. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre a ligação dos STag^{3H} aos macrófagos (*=p<0.05; ****=p<0.0001).</p>

5.4.5 Cinética da captação e internalização de STag^{3H} nativo ou irradiados a
 250Gy e 1500Gy por macrófagos peritoneais de camundongos
 KOCD36^{-/-} ou WTCD36^{+/+}.

Os resultados obtidos em MØs peritoneais resfriados, sugerem que o processamento de antígenos irradiados pode ocorrer por diferentes vias além da via CD36. Após o ensaio de ligação inespecífica, o passo seguinte foi observar o processamento dos STag^{3H} nativo e irradiados em MØCD36^{+/+} ou MØCD36^{-/-}, mantidos a 37 °C e em diferentes períodos de incubação:0, 30,60, 120 e 240 minutos. A contagem de radioatividade (cpm) foi realizada como descrito anteriormente. No

gráfico 24A, podemos observar que a mesma cinética observada em macrófagos J774, foi obtida em macrófagos peritoneais CD36^{+/+}, mostrando crescimento da incorporação do STag^{3H} nativo até 60 minutos e decaimento após 120 minutos. Já os STag^{3H} irradiados, mostraram uma cinética linear de incorporação com crescimento da ligação com o aumento do tempo, esse perfil foi ainda mais evidente na incorporação do STag^{3H} 1500 Gy em MØCD36^{+/+}. Em macrófagos peritoneais CD36^{-/-} (Gráfico 24B) observamos maior incorporação do STag^{3H} nativo, que apresentou uma cinética de ligação crescente e linear com o aumento do tempo, enquanto a incorporação do STag^{3H} 1500 Gy foi menor e decaiu após com aumento do tempo de incubação. Assim como mostramos anteriormente em macrófagos J774, observamos diferença significativa na ligação máxima específica (B_{max}) dos STag^{3H} nativo ou irradiados aos macrófagos peritoneais (p<0.0001). O B_{max} do STag^{3H} nativo em MØCD36^{+/+} foi de 61,85±5,7 e em MØCD36^{-/-} foi de 293±30,36. Para o STag^{3H} 250 Gy o B_{max} em MØCD36^{+/+} foi de 141,2±16,4 e em MØCD36^{-/-} foi de 195±25,7. Por fim, o B_{max} do STag^{3H} 1500 Gy em MØCD36^{+/+} foi de 569,4±12,6 e em MØCD36^{-/-} foi de 66,13±6,7.



Gráfico 24- Diferença na incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a STag^{3H} 250Gy STag^{3H} 1500Gy (1μg/poço) em macrófagos peritoneais **A-**MØCD36^{+/+} ou **B-** MØCD36^{-/-} em diferentes períodos de exposição (0, 0.5, 1.0, 2.0 e 4 horas). Dados apresentados por contagem de radioatividade (cpm). Uma vez que assumimos o fato de as três amostras apresentarem a mesma massa de proteína, realizamos o cálculo da proporção da incorporação do STag^{3H} em MØCD36^{+/+} ou MØCD36^{-/-} (Gráficos 25A e 25B). Os resultados obtidos neste estudo mostram que após 240 minutos o STag^{3H} nativo foi detectado em menor quantidade nos macrófagos MØCD36^{+/+} (Gráfico 25A), após o período de 240 minutos (5%), sugerindo que sua forma mais solúvel foi processada mais rapidamente que os STag^{3H} irradiados, ou ainda que este possa ser mais sensível a atividades proteolíticas. Os STag^{3H} irradiados foram detectados em maior proporção em relação ao STag^{3H} nativo, o que sugere que sua forma menos solúvel os torne processados por mais tempo. Após 240 minutos de incubação, detectamos 15% do STag^{3H} 250 Gy e 30% do STag^{3H} 1500 Gy na superfície dos macrófagos MØCD36^{+/+}. Quando calculamos a proporção da quantidade de STag^{3H} nativo ou irradiados em MØCD36^{-/-}, observamos que após 240 minutos de incubação haviam 41% de STag^{3H} nativo, 24% do STag^{3H} 250 Gy e 6% de STag^{3H} 1500 Gy (Gráfico 25B).



Gráfico 25 - Porcentagem de incorporação de STag^{3H} nativo ou irradiados a STag^{3H} 250Gy STag^{3H} 1500Gy (1µg/poço) em macrófagos peritoneais A-MØCD36^{+/+} ou B- MØCD36^{-/-} em diferentes períodos de exposição (0, 0.5, 1.0, 2.0 e 4 horas).

5.4.6 Detecção da incorporação de STag_F nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy por citometria de fluxo em macrófagos de camundongos WTCD36^{+/+} ou KOCD36^{-/-}.

Avaliamos nesta etapa a proporção individual de incorporação dos STag_F nativo e irradiados a 250 Gy e 1500 Gy em macrófagos CD36^{+/+} e CD36^{-/-} incubados por 1 hora com STag marcados com FITC para fixação e subseguente fenotipagem de sua superfície. A partir da marcação utilizando marcadores específicos para macrófagos, anti-CD68 APC e marcadores específicos para o receptor CD36, anti-CD36 PE, seria possível selecionar as populações celulares macrofágicas quantificar a captação dos STag_F marcados por fluoresceína na mesma célula. A fenotipagem via CD36 foi eficiente para qualificar as células de análise como macrófagos CD36^{+/+} de animais wild type, mas não era aplicável nos macrófagos de animais CD36^{-/-}. A fenotipagem do marcador CD68 foi complexa, apresentando 03 faixas de trabalho, CD68^{Neg}, CD68^{Low}, CD68^{High}. Assim assumimos que macrófagos deveriam ser qualificados com negativos (CD68^{Neg}), inespecíficos (CD68^{Low}), e específicos (CD68^{High}) de acordo com a expressão quantitativa de CD68. A fluorescência detectada no citômetro para o antígeno foi medida e gerou um histograma com duas populações próximas, uma negativa cujo nível de detecção de STag fluorescente era muito próxima do limiar de resolução do citômetro e outra fracamente reagente ao antígeno como esperado, dada a baixa atividade específica. Usando o limiar de corte da população fracamente reagente, estabelecemos a positividade para o STag nas várias populações selecionadas para CD68, sem a necessidade de selecionar pelo CD36 e assim comparar os dois tipos de animais utilizados.

No Gráfico 26, apresentamos a captação e internalização dos STag_F nativo ou irradiados nas populações de macrófagos peritoneais de camundongos normais CD36^{+/+} ou CD36^{-/-} determinada por citometria de fluxo em células individuais

CD68^{High}CD36⁺ fenotipagem CD68^{High}CD36⁻ selecionadas pela com е respectivamente. As células CD68^{low} apresentaram uma menor captação que o CD68^{High} e as células CD68^{Neg} não apresentaram captação de STag_F. Assim como apresentado em dados anteriores em ensaios de ligação coletivos, podemos observar que em macrófagos CD36^{+/+} houve maior proporção de células específicas marcadas com os STag testados, sendo que o STag_F 1500 Gy foi mais incorporado do que os STag_F nativo ou irradiado a 250 Gy. Quando observamos a incorporação dos STag_F. a proporção de macrófagos CD68^{High} incorporando STag_F nativo (12%), foi menor do que a encontrada em macrófagos CD36^{+/+} (18%). Analisando os STags, observamos que houve uma menor proporção de macrófagos CD36^{-/-}CD68^{High} incorporando os STags. O STag_F 250 Gy em macrófagos CD36^{+/+} foi incorporado por 23% das células, e em macrófagos CD36^{-/-} apenas 1%. Este fenômeno foi mais intenso na incorporação de STag_F 1500 em macrófagos CD36^{-/-} onde a incorporação foi de 3% enquanto em macrófagos em CD36^{+/+} a incorporação foi de 30%, o que mostra a importância do CD36 na incorporação dos STags irradiados. Interessante notar que macrófagos normais também mostraram maior incorporação de STags irradiados em relação ao STag nativo guando analisado em células individuais por citometria de fluxo.



Gráfico 26- Porcentagem de incorporação de STag nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy conjugados ao FITC em macrófagos peritoneais obtido de camundongos: A- C57BI/6jCD36^{+/+} (MØWTCD36^{+/+}; CD68^{High} CD36^{+High}); B- C57BI/6jCD36^{-/-} (MØWTCD36^{-/-}; CD68^{High} CD36^{Neg}).

Com base nos resultados apresentados demonstramos o envolvimento do receptor CD36 na captação de proteínas irradiadas, com vasta bibliografia em arteriosclerose, que é causada pela absorção e não degradação de lipídeos oxidados¹⁹⁷. Usando animais deficientes geneticamente do receptor CD36, demonstramos que STag 1500 Gy foi menos captado por macrófagos peritoneais de animais CD36^{-/-}, fenômeno observado também por citometria de fluxo em células isoladas. Isto demonstra que o CD36 dirige seus aceptores a uma via diferente das usuais, como os dos receptores *Scavenger* tipo I ou receptores de manose¹⁹⁸, que são receptores voltados para a reutilização de monômeros pela célula, envolvidos na captação de proteínas de vitelo ou de produtos de células apoptóticas¹⁹⁹ que não devem ser apresentados para resposta imune, o que seria prejudicial. A via do CD36 de produtos oxidados, levaria por macropinocitose¹²³ os produtos ao mesmo

compartimento onde estão os MHC que se ligariam aos peptídeos dos produtos e os levariam para superfície celular para sua apresentação. Nossas observações por microscopia demonstram que os antígenos irradiados permanecem muito mais tempo íntegros dentro dos compartimentos celulares de células macrofágicas. Esses dados sugerem que a captação via receptor CD36 pode ter sido utilizada pela resposta imune como um marcador de antígenos, assim como ocorreria no combate de inflamação aguda, auxiliando na seleção e montagem de uma resposta adaptativa mais seletiva e lucrativa.

5.4.7 Resposta imune humoral induzida em camundongos C57BI/6j (WTCD36^{+/+}) e camundongos *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}), imunizados por via subcutânea com STag nativo ou irradiado a 250Gy e 1500Gy por fonte homogênea de Co-60.

Apresentamos o ensaio de imunização de camundongos *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}; Gráfico 27) com três doses quinzenais de STag nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy, e albumina de soro bovino (BSA) como um imunógeno controle, por via subcutânea (10µg/0,1mL/animal). Em camundongos WTCD36^{+/+}, a imunização com STag 250 Gy e STag 1500 Gy induziram maiores concentrações de anticorpos IgG anti-*T. gondii do* que o STag nativo (p<0.05). Os animais KOCD36^{-/-} apresentaram baixas concentrações de anticorpos IgG anti-*T. gondii independente* do STag utilizado, sendo possível identificar um discreto aumento de anticorpos em animais imunizados com STag nativo em comparação aos imunizados com STag irradiados (p<0.05). O imunógeno controle, utilizado (BSA nativa), não se mostrou eficiente na produção de anticorpos IgG anti-BSA nos animais WTCD36^{+/+}, o que pode ser explicado por suas características antigênicas. Trata-se de uma proteína com poucos epítopos reagentes, além disso, é uma

proteína sérica de mamífero, e provavelmente tenha sido eliminada na seleção clonal da vida fetal, restando poucos epítopos para uma estimulação efetiva. Em animais KOCD36^{-/-} a proteína BSA nativa, também não induziu produção significante de anticorpos IgG anti-BSA, mas independentemente do resultado, este ensaio foi capaz de demonstrar que a menor produção de anticorpos pela via da resposta imune adaptativa em animais KOCD36^{-/-}, é um fenômeno característico nestes animais, o que era nosso objetivo.



Gráfico 27 - Comparação da produção de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* ou anti-BSA no soro de camundongos C57BI/6jCD36^{+/+} (WTCD36^{+/+}) e C57BI/6jCD36^{-/-} (KOCD36^{-/-}) imunizados com três doses quinzenais por via subcutânea com STag nativo ou STag irradiados a 250Gy e 1500Gy e BSA nativa, detectados por ELISA. Linha tracejada representa a produção basal de IgG. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (*=p<0.01; **, ***=p<0.05; ****=p<0.0001).</p>

As mesmas amostras foram submetidas a ação de reagente caotrópico (uréia 6M) para detecção da avidez dos anticorpos IgG (Gráfico 28). Em animais WTCD36^{+/+}, o STag nativo induziu menor maturação de anticorpos em comparação aos grupos imunizados com STag 250 Gy (p<0.05) e 1500 Gy (p<0.001). A proteína BSA nativa não induziu maturação dos anticorpos IgG. Os animais KOCD36^{-/-} não apresentaram maturação significativa de anticorpos, independente do imunógeno estudado.



Gráfico 28- Comparação da porcentagem da avidez de anticorpos IgG específicos em camundongos WTCD36^{+/+} e KOCD36^{-/-}, imunizados por via subcutânea com STag nativo ou irradiados a 250Gy e 1500Gy ou BSA nativa detectados por ELISA. Asteriscos representam diferença significativa entre os grupos imunizados (**= p<0.05, *** = p<0.01, **** = p<0.001).</p>

Nos animais KOCD36^{-/-} detectamos baixas concentrações de anticorpos IgG específicos comparadas as concentrações demonstradas nos animais WT. Além disso não houve maturação da avidez destes anticorpos, independente do antígeno

utilizado (Figuras 26). O antígeno controle utilizado (BSA) foi menos eficiente que o STag nativo na produção de anticorpos em animais normais, provavelmente por suas características antigênicas. Animais KOCD36^{-/-} imunizados apresentaram produção mínima ou ausente de anticorpos, sem nenhuma maturação de avidez, mostrando que o fenômeno de baixa produção de anticorpos específicos em animais CD36^{-/-} foi um fenômeno que independe do imunógeno utilizado e deve ser característico da imunidade destes animais. É interessante notar que apesar das baixas concentrações de anticorpos, algum anticorpo foi produzido, o que sugere que outras vias de apresentação de antígenos independentes do CD36 possam estar funcionando nestes animais. Estudos utilizando a cepa atenuada R36A de Streptococcus pneumoniae, mostraram diminuição nas concentrações de IgG específicas nesses animais²⁰⁰, assim como demonstrado em nosso estudo com a imunização utilizando os STag. O alto nível de IgM encontrado em seu soro (Gráfico 19) sugere que parte desta imunidade pode estar relacionada a ativação direta de linfócitos B em uma resposta T independente²⁰⁰. A ausência de maturação de avidez nesses animais sugere que o braço principal de seleção de anticorpos também está sendo afetado pela ausência de CD36. A segunda e a terceira sinapses imunológicas dependem da seleção inicial das células CD4 responsivas por APCs e na ausência desta o ciclo seria interrompido impedindo a maturação da avidez, sugerindo outras vias de ativação de célula B²⁰¹.

5.4.8 Desafio de camundongos C57BI/6jCD36^{+/+} e C57BI/6jCD36^{-/-} imunizados com STag nativo e irradiados a 250 Gy e 1500 Gy de Co-60, com cepa RH (Tipo I) virulenta e cepa cistogênica M-49 (Tipo II) de *T. gondii.*

5.4.8.1 Cepa RH.

Os grupos imunizados foram desafiados com 10³ taquizoítos 15 dias após a terceira dose de imunização. Apresentamos no gráfico 29 a sobrevida de camundongos WTCD36^{+/+} (Gráfico 29A) e KOCD36^{-/-} (Gráfico 29B) imunizados com STag nativo e STag irradiados a 250 Gy e 1500 Gy. Camundongos WTCD36^{+/+} (Gráfico 29A) imunizados apresentaram aumento significante de sobrevida em comparação a sobrevida do grupo controle não imunizado que sobreviveu por 3,5 dias após o desafio (p<0.0001). Animais imunizados com STag nativo sobreviveram por 10 dias. A imunização com STag 250 Gy e STag 1500 Gy aumentou a sobrevida dos animais por 12 e 15 dias, sendo que 1 animal imunizado com STag 1500 Gy sobreviveu por mais de 20 dias sem manifestações aparentes da infecção. No gráfico 29B, podemos observar que a sobrevida dos animais KOCD36^{-/-} imunizados não apresentou diferença em relação a sobrevida do grupo controle não imunizado. A imunização com STag nativo aumentou a sobrevida dos animais por 5 dias. Enquanto os STag irradiados a 250 Gy e 1500 Gy sobreviveram somente por 4 e 3,5 dias.



Gráfico 29- Porcentagem (%) da sobrevida de camundongos. A- C57BI/6jWtCD36^{+/+} e B- C57BI/6jKoCD36^{-/-} imunizados com STag nativo ou STag 250 Gy e STag 1500 Gy e desafiados com 10³ taquizoítos viáveis da cepa RH virulenta 30 dias após a última dose de imunização. Asteriscos representam a diferença entre as curvas de sobrevivência entre grupo controle e imunizado pelo teste Log-Rank.

5.4.8.2 Cepa ME-49.

O desafio utilizando a cepa virulenta RH mostrou uma alta susceptibilidade dos animais KOCD36^{-/-} ao desafio. 3 dias após o desafio mesmo os animais imunizados morreram apresentando sinais característicos da infecção. Diante disso,

grupos KOCD36^{-/-} imunizados com STag nativo, STag 250Gy e STag 1500Gy foram desafiados com a cepa cistogênica ME-49. Animais normais imunizados mostram proteção significativa com diminuição do número de cistos cerebrais e sobrevida até o momento de sacrifício para a retirada do cérebro para contagem dos mesmos (30 dias após o desafio). Após o desafio de camundongos KOCD36^{-/-} com 10 cistos/animal, os camundongos sobreviveram por no máximo 5 dias, apresentando fortes sinais da infecção. Outro ponto interessante foi em relação ao número de cistos observados na microscopia ótica e o tamanho dos cistos que em animais previamente imunizados costumam sem menores.



Figura 19- Microscopia ótica de macerado de cérebro de camundongos KOCD36^{-/-} imunizados com STag nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy demonstrando a presença de cistos da cepa ME-49 de *T. gondii indicados* pelas setas. Aumento de 40x.

Do ponto de vista da imunização e desafio com cepas viáveis, animais KOCD36^{-/-} não foram passiveis de imunização contra toxoplasmose por STag nativo ou irradiado a 1500 Gy, sem produção significativa de anticorpos e totalmente suscetíveis ao desafio com cepas viáveis, o que poderia ser explicado pela participação do CD36 nos passos iniciais da resposta imune, já que animais com outras deficiências imunológicas da resposta inata são resistentes a infecção e somente animais com deficiência na resposta adaptativa são suscetíveis a toxoplasmose³⁸. Outra explicação, seria pelo fato de que o sensoriamento da resposta imune pelo agente, ou via interferon ou via óxido nítrico, induz sua

conversão para formas de resistência em cistos e controle da infecção aguda^{13,43}, o que não ocorreria em animais CD36^{-/-}, gerando uma infecção aguda descontrolada. Interessante notar que a histologia dos órgãos linfoides destes animais se mostrou pouco alterada, em especial no timo e baço, dois órgãos linfóides importantes para a resposta adaptativa. Existem vias alternativas para a resposta imune adaptativa $\alpha\beta$ clássica, como linfócitos B1²⁰², linfócitos da linhagem $\gamma\delta^{203}$ e outras vias de produção de imunidade específica menos variável, como células NK, mas estas vias não induzem a produção de anticorpos IgG específicos para o *T. gondii*, nem a produção significativa de ativação tissular pelo IFN produzido por células T CD4 e CD8 específicas, permitindo o escape da infecção aguda²⁰⁴.

5.4.9 Perfil celular observado em linfócitos do sangue periférico de camundongos *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-}, imunizados por via subcutânea com STag nativo ou irradiado a 250Gy e 1500Gy.

O próximo passo foi avaliar o perfil da resposta celular de camundongos KOCD36^{-/-} imunizados com STag nativo e irradiado a 250 Gy e 1500 Gy, por citometria de fluxo. Apresentamos a seguir os resultados expressos em porcentagem (%), a proliferação de células B (CD19⁺), células B ativadas (CD19⁺CD23⁺), células B de memória (CD19⁺CD27⁺), linfócitos T auxiliares (T CD3⁺CD4⁺), linfócitos T citotóxicos (T CD3⁺CD8⁺), linfócitos T ativados (CD19⁻CD44⁺) e linfócitos T de memória (CD19⁻CD45RB⁺) por estímulo específico na presença de extrato antigênico total de *T. gondii.* Em animais KOCD36^{-/-} a porcentagem de linfócitos T CD3⁺ foi de 6% em animais imunizados com STag nativo, 4% em animais imunizados com STag 250 Gy e 2,4% em animais imunizados com STag 1500 Gy (Gráfico 30A). A porcentagem de linfócitos T auxiliares (T CD3⁺CD4⁺; gráfico 30B) foi de 0,17% em animais imunizados com STag nativo, 0,13% em animais imunizados com STag

250Gy e 0,10% em animais imunizados com STag 1500Gy. A porcentagem de linfócitos T citotóxicos (T CD3⁺CD8⁺; gráfico 30C), foi de 0,18% em animais imunizados com STag nativo, 0,16% em animais imunizados com STag 250Gy e 0,14% em animais imunizados com STag 1500Gy. A porcentagem de células B (CD19⁺; gráfico 30D) foi de 10% em animais imunizados com STag nativo, 7,5% em animais imunizados com STag 250Gy e 6% em animais imunizados com STag 1500Gy.



Gráfico 30- Proporção (%) de linfócitos T, A- totais; B- CD3⁺CD4⁺; C- CD3⁺CD8⁺ e D- células B (CD19⁺) obtidos no sangue periférico de camundongos *knockouts* C57BI/6jCD36^{-/-}, imunizados com STag nativo ou irradiado a 250 Gy e 1500 Gy de Co-60. Asteriscos representam diferença estatística entre os grupos (*=p<0.01; **, ***=p<0.05; ****=p<0.0001).

No gráfico 29, apresentamos a porcentagem de proliferação de células B (CD19⁺) ativadas (CD19⁺CD23⁺; gráfico 31A) e de memória (CD19⁺CD27⁺; gráfico 31B), e linfócitos T ativados (CD19⁻CD44⁺; gráfico 31C) e de memória (CD19⁻CD45RB⁺; gráfico 29D). Animais KOCD36^{-/-}, imunizados com STag nativo

apresentaram 1,8% de células B ativadas e 2,5% de células B memória. Para o STag 250 a porcentagem de células B ativadas foi de 1,4% e 1,2% de células B de memória. O STag 1500 Gy induziu 1,2% de célula B ativadas e 0,7% de células B de memória. A ativação de linfócitos T em animais KOCD36^{-/-} imunizados com STag nativo foi de 0,9% e 1,2% de memória. Animais imunizados com STag 250 Gy apresentaram 0,6% de linfócitos T ativados e 1,1% de linfócitos T de memória. Em animais imunizados com STag 1500 Gy foram observados 2% de linfócitos T ativados e 0,7% de linfócitos T de memória.



Gráfico 31- Proporção (%) de linfócitos B e T ativado e de memória obtidos no sangue periférico de camundongos *knockouts* C57Bl/6jCD36^{-/-}, imunizados com STag nativo ou irradiado a 250Gy e 1500Gy de Co-60. A- Células B ativadas (CD19⁺CD23⁺); B- células B de memória (CD19⁺CD27⁺); C- Linfócitos T de memória (CD19⁻CD44⁺); D-Linfócitos T de memória (CD19⁻CD44RB⁺). Asteriscos representam diferença estatística entre os grupos (*=p<0.01; **, ***=p<0.05; ****=p<0.0001).

Nossos dados mostram que animais KOCD36^{-/-} apresentaram baixas porcentagens de células T auxiliares (TCD3⁺CD4⁺) e T citotóxicas (TCD3⁺CD8⁺),

ativadas ou de memória no sangue, com um discreto aumento em comparação ao grupo controle não imunizado, somente no grupo imunizado com STag nativo. A porcentagem de células B (CD19⁺) foi maior nos grupos imunizados em comparação ao grupo controle, com maior proliferação de células CD19⁺ em animais imunizados com STag nativo, porém com baixíssimas porcentagens de ativação e memória. A proliferação de linfócitos T induzem uma resposta imune protetora. Após a imunização APCs, absorvem os antígenos que devem ser apresentados para célula T naïves, que serão estimuladas a proliferar e se diferenciar em células efetoras e de memória. A baixa porcentagem de ativação e memória de células T e B obtidas em animais KOCD36^{-/-}, pode ser relacionada a alta suscetibilidade dos animais após o desafio com diferentes cepas de T. gondii. Estudo utilizando animais CD36^{-/-}, mostraram que estes animais apresentam normalidade da zona marginal de células B, porém aprestam bloqueios nos estágios de transição para células B maduras, interferindo na resposta inata inicial e no reconhecimento de anticorpos primários, o que resultaria em produção de células do plasma, porém de curta duração²⁰¹. Antígenos livres são em sua maioria processados por ação de proteassomas, que são transportados para o retículo endoplasmático por um transportador associado ao processamento de antígenos (TAP), seguido da apresentação para MHC do tipo I²⁰⁵. Estes dados mostram que a participação do CD36 pode estar relacionada ao transporte intracelular diferencial de antígenos, aumentando a apresentação via MHC de classe I, e sua deficiência afetou a montagem da resposta de células T para antígenos que seriam selecionados por CD36, mas não tanto os apresentados por outras vias de apresentação de antígenos.

5.4.10 Avaliação da resposta imune humoral induzida em animais KOCD36^{-/-} transplantados com macrófagos peritoneais de animais WTCD36^{+/+} "primados" com STag nativo ou irradiado a 1500Gy.

A resposta imune humoral, protetora e celular de camundongo KOCD36^{-/-} mostraram que estes animais produzem níveis basais de anticorpos IgG específicos e são extremamente suscetíveis a doenca, pós-desafio e apesar de apresentarem células B, estas não apresentaram porcentagem de memória e ativação significante. Neste contexto, resolvemos avaliar se o transplante de células imunes (macrófagos peritoneais de animais WTCD36^{+/+} "primados" com STag nativo e STag 1500 Gy), induziriam uma cooperação celular com aumento de anticorpos anti-T. gondii. O desenho experimental foi baseado no conceito das sinapses imunológicas, sendo que a primeira sinapse imunológica envolve a cooperação entre uma APC e linfócitos T CD4 ou CD8, gerando o crescimento de células responsivas específicas. Após estas sinapses, uma nova exposição de antígenos deve apenas resultar no crescimento (segunda sinapse) e seleção (terceira sinapse) das células linfoides responsivas. Então, se substituirmos os macrófagos envolvidos na primeira sinapse por macrófagos contendo CD36 e primados com o antígeno, um animal CD36^{-/-} pode responder com anticorpos específicos a novos desafios com o antígeno por ter já selecionado as células T responsivas na primeira sinapse.

No gráfico 32, apresentamos a resposta imune humoral induzida em camundongos KOCD36^{-/-} transplantados com macrófagos peritoneais MØCD36^{+/+}, primados com STags nativo ou irradiado a 1500 Gy e imunizados por mais duas ou três doses somente com STags, por via subcutânea. Não observamos diferença significativa entre as concentrações de anticorpos IgG anti-*T. gondii* detectadas nos animais KOCD36^{-/-} imunizados somente com três doses de STag nativo ou transplantados com STag nativo+MØCD36^{+/+}. Quando comparamos a concentração

de anticorpos IgG específicos em animais imunizados somente por STag 1500 Gy e em animais imunizados com STag 1500 Gy+MØCD36^{+/+}, podemos observar um aumento significativo na produção de anticorpos nos grupos recipiente MØCD36^{+/+} mais STag 1500 Gy (p<0.0001).



Gráfico 32- Comparação da produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro de camundongos knockouts C57BI/6jCD36^{-/-} imunizados com três doses subcutâneas de STag nativo ou STag 1500Gy ou transplantados com macrófagos peritoneais de camundongos normais "primados" com STag nativo ou STag 1500Gy. Barras representam a média e o erro padrão da média. Asteriscos representam a diferença significativa entre os grupos (****=p<0.0001).</p>

Demonstramos que o transplante de animais CD36^{-/-} com células APCs "primadas" compatíveis da mesma linhagem e MHC gerou a produção de anticorpos IgG em animais deficientes de CD36. Esses resultados sugerem que o passo limitante para a produção de IgG nestes animais pareceu ser solucionado pela substituição de APCs apesentando o receptor CD36. Apesar de se tratar de um experimento preliminar os resultados nos abre novas perspectivas em relação ao processamento de antígenos, desde sua seleção até seu processamento intracelular diferencial que é determinado pela seguência de eventos subcelulares após sua captação via CD36. Esta captação parece promover uma distribuição celular diferente e vantajosa para resposta imune, embora possa causar efeitos colaterais como a arteriosclerose. O CD36 é uma molécula ubíqua e seu uso pela resposta imune adaptativa deve ter sido um fenômeno a posterior ao de sua existência no sistema imune, que utiliza sua especificidade receptora e metabolismo celular para promover a seleção de antígenos e assim resultar em uma produção econômica de células responsivas sem a necessidade de um grande volume de células APCs que seria incompatível com uma resposta imune eficiente. Pensar em imunologia hoje, deve ser diferente e este o pensamento deve se basear na observação. A radiação ionizante foi uma ferramenta que mostrou uma nova faceta da interface das respostas inata e adaptativa que mostramos em nosso trabalho e que nada mais é a verdade da natureza "nada se perde, tudo se utiliza".

6 DISCUSSÃO GERAL

O uso da radiação ionizante em extratos antigênicos de T. gondii permitiu a construção de um imunógeno acelular eficiente para a proteção de camundongos contra a infecção após o desafio com cepas viáveis. As alterações foram mínimas nos extratos, o que nos sugeriu que estas alterações modificavam seu destino celular, indicando um segmento saturável de atuação, dada a perda de efeito com doses maiores de antígenos. O efeito da radiação foi dose dependente e sempre na ausência de adjuvantes, com uma resposta diferente da observada com o uso de taquizoítos esterilizados por radiação, com ativação de uma resposta imune de perfil Th2. Mostramos que ocorre uma ligação e captação específicas em macrófagos, não degradativa, provavelmente via CD36, demonstrada pelo uso de bloqueadores de receptores Scavenger. Em animais CD36^{-/-}, mostramos que os antígenos irradiados sem o reconhecimento destes receptores perdem sua imunogenicidade e não são preferencialmente captados por macrófagos destes animais. O transplante destes animais com macrófagos normais primados com antígeno irradiado promoveu uma recomposição de sua capacidade de produzir anticorpos específicos. Neste contexto podemos sugerir que a radiação ionizante induz a oxidação do extrato antigênico levando o seu reconhecimento preferencial por CD36, resultando num direcionamento intracelular que favorece sua apresentação na resposta imune adaptativa, gerando o aumento de sua imunogenicidade, o que vem a ser um processamento ideal para vacinas de subcomponentes.

Uma vacina para toxoplasmose deve ser capaz de contemplar a proteção contra a infecção e contra a doença. Nossos dados mostraram que o STag irradiado a 1500Gy foi capaz de aumentar as concentrações de anticorpos IgG específicos e sua afinidade, protegendo animais imunizados após o desafio com cepa viável de *T*. *gondii*, induzindo resposta imune celular com células B (CD19⁺) e células T CD4⁺ e

CD8⁺, mostrando um direcionamento para a produção de anticorpos específicos capazes de conter a infecção, com menor produção de linfócitos T CD8⁺ que a imunização com taquizoítos íntegros irradiados. A imunização com taquizoítos íntegros irradiados mostrou ser maior indutora de células T CD8⁺ e menor indutora de anticorpos, o que mostra uma tendência a eliminar células infectadas²⁰⁶ e, portanto, controla a doença após a infecção, como descrito em outros modelos⁴⁴.

A imunização com STag irradiado mostrou ser eficiente na indução de células T CD4⁺, que são responsáveis em induzir respostas via células B²⁰⁷, como o encontrado em nossos dados. Trabalhos com animais deficientes de células T CD4⁺ mostram que estes animais exibem menores títulos de anticorpos específicos^{37,208}. As células T CD4⁺ responsivas cooperam com as células B e as células T CD8⁺, mas estas também têm uma via alternativa de seleção direta via APCs²⁰⁹, que parece ser a mais ativa na imunização com taquizoítos. Então, podemos sugerir que nosso extrato irradiado foi preferencialmente direcionado para células T CD4⁺, resultando indiretamente na cooperação para a produção de células T CD8⁺. Isto implica em que apenas um receptor precisa estar envolvido nesta ativação imune, diferente do mecanismo de ativação do parasito irradiado, onde tanto a via de APC para T CD4⁺ como a via de APC para T CD8⁺ parecem estar ativadas. Este processo de ativação depende do MHC envolvido na ativação, sendo que o MHC de classe I ativa diretamente células T CD8⁺ e o MHC de classe II ativa células T CD4⁺²¹⁰. Os mecanismos intracelulares de seleção destes antígenos devem ser diferentes e o MHC de classe I por ser ativado via antígenos particulados de restos dos taquizoítos irradiados, enquanto que o MHC de classe II é envolvido na ativação de células CD4 que irão ativar células B e CD8. Isto sugere que o STag irradiado deve ativar preferencialmente o MHC de classe II.

Mostramos que a imunização com massa de 10µg de proteína por camundongos, induziu maiores títulos de anticorpos específicos e quantidade

substantiva de células T CD8⁺, podendo cooperar tanto para a proteção contra a infecção como com a proteção contra a doença²¹¹, mais do que o observado na imunização com taquizoítos íntegros irradiados ou com doses maiores de STag irradiado que mostraram valores semelhantes de ativação imune. Maiores quantidades de antígenos podem induzir tolerância imunológica¹⁶⁰ ou não aumentam a resposta imune, sugerindo que a resposta imune pode ser limitada a um número de células responsivas ou a um repertório fixo de células imunes²¹².

Uma vez que a havia a chance de uma única via de captação do STag irradiados e a literatura descreve a captação preferencial de toxina irradiada via receptores Scavenger⁸¹, realizamos o estudo da ligação e captação de STag, marcados por diferentes formas, em macrófagos. Neste estudo, ensaios de ligação utilizando células macrofágicas J774 ou macrófagos peritoneais de camundongos, mostraram que o STag irradiado a 1500Gy apresentou uma cinética de ligação linear e crescente, e com maiores índices de ligações específicas que o STag nativo (não irradiado). A curva de captação não apresentava decréscimo sugerindo que os antígenos irradiados não estavam sendo degradados intracelularmente como o antígeno nativo. Isto sugere diferentes vias citoplasmáticas de processamento, já que a susceptibilidade a proteólise externa foi igual entre os antígenos. Existem diferentes vias de processamento de proteínas internalizadas pelas células, a maior parte delas envolve lisossomos e rápida degradação do produto captado¹³⁵. Em nossos estudos utilizando marcações fluorescentes, mostramos que os antígenos irradiados permanecem nas células por mais tempo que o antígeno nativo, assim como demonstrado em ensaios realizados com crotoxina irradiada¹⁴³, mostrando ser um processo conservado para proteínas irradiadas.

A captação da crotoxina irradiada foi bloqueada por probucol⁸¹, e em nossos ensaios a ligação dos STag irradiados foi afetada na presença de bloqueadores de receptores *Scavenger*, dextran sulfato e probucol. O dextran sulfato foi menos

eficiente e também afetou a ligação do STag nativo nos macrófagos. O SR-A é um receptor de cargas negativas como a superfície de células apoptóticas¹³¹ ou vacúolos autofágicos das células e promove a sua ligação intracelular à lisossomos promovendo uma rápida degradação dos produtos fagocitados até monômeros reutilizáveis²¹³, portanto não parece ser a via envolvida na imunogenicidade pois resultaria na degradação completa e não seletiva dos antígenos, resultando em ausência de imunogenicidade. O probucol, está envolvido no blogueio da captação de produtos oxidados e funciona para arteriosclerose diminuindo a formação de placas por produtos oxidados²¹⁴. Este bloqueador foi o mais eficiente no bloqueio da captação do STag irradiado em macrófagos normais e já havia sido descrito como mais eficiente no bloqueio da captação de crotoxina irradiada⁸¹. A radiação ionizante induz a oxidação de proteínas via radicais hidroxila (OH•), induzido pela radiólise da água semelhante ao produto produzido por peroxidases⁶⁸. A produção e retirada de radicais hidroxila ocorre principalmente intracelularmente em peroxissomos, organelas especializadas²¹⁵. A única peroxidase extracelular em mamíferos é a mieloperoxidase de neutrófilos que é liberada no local da inflamação aguda na netose dos neutrófilos²¹⁶. A mieloperoxidase apresenta uma reação muito eficiente e por se ligar a rede de fibras de DNA geradas na netose, promove uma oxidação via haletos das proteínas que estão no local da inflamação²¹⁷. Esta oxidação de proteínas foi sugerida como uma forma de aumentar a apresentação de antígenos⁹⁶ e a radiação ionizante pode mimetizar esta reação biológica. Então por sua hidrossolubilidade e oxidação, as proteínas irradiadas devem ser reconhecidas pelo receptor Scavenger CD36 das células, pela oxidação e pelo bloqueio pelo probucol. Baseados nisso, optamos por estudar a captação dos STag irradiados em animais geneticamente deficientes deste receptor.

Existem relatos que animais deficientes de CD36 apresentam alguns distúrbios imunológicos, porém pouco estudados¹¹⁸. Em nosso estudo

demonstramos normalidade histológica em baco, timo e fígado bem como níveis habituais de imunoglobulinas circulantes com um aumento discreto de IgM. Macrófagos provenientes desses animais apresentaram um comportamento inverso na cinética de ligação dos STag, sendo o STag nativo mais captado que o STag irradiado, praticamente sem captação por estes macrófagos quando comparado ao macrófago de animais normais. A imunização destes animais mostrou baixas concentrações de anticorpos específicos e uma alta suscetibilidade ao desafio com cepas viáveis de T. gondii, tanto virulentas (cepa RH, tipo I) como cistogênicas (cepa ME-49, tipo II), com morte precoce dos animais imunizados. Estes resultados mostram a ineficiência dos STag nativo na produção de imunidade já que sua captação foi afetada pela ausência de CD36. Estes animais apresentaram baixas concentrações de anticorpos séricos IgG específicos quando estimulados por outros antígenos, como o STag nativo ou BSA, mostrando um defeito na produção de anticorpos via resposta imune adaptativa, mas não em outros tipos de repostas humorais. Os níveis séricos de anticorpos devem ser mantidos por outras vias de produção como imunidade inata¹¹⁰, ou outros tipos de apresentação de antígenos via APCs alternativas ou células B²¹⁸. Os maiores níveis de IgM sérica demonstrados em nosso trabalho, comprovariam a participação dessa via alternativa na produção de anticorpos, uma vez que anticorpos IgM são mais produzidos para manter a homeostase tecidual devido sua capacidade de se ligar a antígenos como os expressos por células apoptóticas²¹⁹.

A molécula CD36 na resposta imune é amplamente relacionada como auxiliar no metabolismo de linfócitos por sua captação de ácido graxos livres²²⁰, e algumas vezes citado como cooperante indireta na resposta imune¹⁹⁸, apenas com a finalidade de aumentar a energia e a eficiência das células imunes. A captação de ácidos graxos por CD36 segue vias citoplasmáticas endocíticas e não lisossomais²²¹, sugerindo a possibilidade da participação de caveolinas ou de *rafts* de membranas

na construção de vesículas endocíticas do trafego intracelular de lipídios para o reticulo endoplasmático liso¹³⁵. A reciclagem das vesículas citoplasmáticas envolve um trânsito sequencial pelo reticulo endoplasmático liso, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi²²². Moléculas de MHC são sintetizadas no reticulo endoplasmático rugoso e liberadas por vesículas a partir do trans-golgi¹³⁵. Se as vesículas endocíticas geradas pelo CD36 forem recicladas pelas células na ausência de proteólise, o produto ligado ao CD36 transportado sem ser degradado no interior da vesícula pode alcancar o reticulo endoplasmático rugoso e se ligar ao MHC de classe II recém-sintetizado, sendo transportado para superfície celular após proteólise parcial. As vias intracelulares de apresentação de antígeno ainda são controversas e é devem existir diversas vias para este fim. O rendimento do processo imune depende de uma seleção de proteínas para apresentação, evitando uma apresentação genérica e custosa de proteínas internas que devem ser degradadas e reutilizadas. Uma forma de seleção lógica seria a apresentação preferencial de proteínas que foram expostas a inflamação. O CD36 como receptor multiespecífico especial, por não ter domínios intracitoplasmáticos ou ligação com o sistema clatrinalisossoma¹²¹, parece ser um candidato para esta finalidade, por reconhecer produtos oxidados, um tipo de radical que é produzido na inflamação aguda pela ação da mieloperoxidase extracelular. Assim, o uso de um receptor multiespecífico com afinidade para produtos oxidados e uma via intracelular específica sem proteólise, pode resultar numa seleção de alvos mais adequado processamento de apresentação e criação de uma resposta imune adaptativa.



Figura 20- Esquema de processamento intracelular de antígenos hidrossolúveis em relação ao tipo de receptor celular utilizado em sua captação pelo sistema de vesículas de APCs. A- Antígenos nativos e solúveis; B- Antígenos oxidados ou irradiados; C- Antígenos oxidados ou irradiados. Tabela 3- Intensidade sugerida para cada um dos processos.

Outro aspecto importante deste processo é a que a densidade de CD36 na superfície das células que não deve ser elevada, sugerida por algumas características deste receptor. Ele está relacionado ao manejo de ácidos graxos livres e seu transporte para dentro da célula, portanto sua afinidade por esse substrato deve ser menor que a dos receptores intracelulares, provavelmente FAPBs¹⁴⁰. Como ele é transportado para o interior vias *rafts* de lipídios¹³⁶, e não sofre proteólise neste processo, ele pode ser recolocado na superfície celular sem a necessidade de nova síntese, garantindo o transporte dos ácidos graxos livres, e economizando síntese de receptores pela célula. Sua estrutura molecular apresenta um túnel onde passam os ácidos graxos livres para o interior celular¹⁴⁰, e a parte de entrada deste túnel deve ser o receptor multiespecífico de moléculas maiores que ácidos graxos, que se ligam a esta entrada, bloqueando o túnel de transporte, assim essas moléculas seriam endocitadas para a célula quando o CD36 faz seu ciclo

celular. As vesículas envolvidas seriam as vesículas endocíticas revestidas de lipídios¹²¹, e sem moléculas características de vesículas de diferentes funções na célula, como as revestidas por clatrina ou caveolinas¹³⁵.

Nossos ensaios preliminares de transplante de macrófagos normais "primados" com STag nativo ou irradiado para animais CD36^{-/-}, mostraram aumento significante na produção de anticorpos específicos induzido por macrófagos normais, mais expressivo na imunização com STag irradiado. Estes resultados foram essenciais para demonstrar a participação do receptor CD36 no melhor processamento e apresentação de proteínas modificadas pela radiação, e que estas modificações podem aprimorar a cooperação celular induzindo o crescimento de células responsivas mais específicas. Antígenos exógenos são endocitados por APCs e apresentados em MHC da classe II¹³⁷. Células dendríticas são um exemplo de um tipo celular capaz de transportar os antígenos internalizados para o citosol celular. Estudos utilizando ovalbumina (OVA) carregada negativamente por succinilação, maleilação e cisacetinilação, mostraram uma maior apresentação em células dendríticas da OVA maleilada (um tipo de oxidação catalítica) mediada entre receptor Scavenger e vias citosólicas¹¹⁷. Ao invés da maleilação e do processo químico agressivo utilizado nesta síntese, a radiação processa o antígeno com melhor reconhecimento e processamento, sem a adição de nenhum processo químico as proteínas.

A fagocitose inicialmente foi relacionada a um mecanismo da imunidade inata, capaz de eliminar agentes exógenos²²³. Atualmente com a caracterização de células dendríticas como APCs e braços da resposta imune inata para resposta imune adaptativa, sabe-se que há uma interação entre as estas vias e que estas necessitam de diferentes rotas para a apresentação de antígenos²²⁴. O mecanismo de maturação de lisossomos via receptores especializados, presentes em APCs profissionais como célula dendríticas, macrófagos e neutrófilos mostram que a fagocitose em condições inflamatórias são capazes de aumentar a apresentação de um antígeno¹⁷⁹. As vias
pelas quais um antígeno endocitado é transportado, podem ser mediadas por clatrinas, ou caveolinas ou ainda por *rafts* lipídicos, que vão auxiliar sua internalização em vesículas especializadas para o processamento e apresentação para moléculas MHC²²⁵.

A irradiação de uma proteína ou extrato mimetiza a passagem por um local de inflamação aguda com liberação de produtos de neutrófilos, para direcionamento de um antígeno para uma melhor resposta imune adaptativa. Isto é provavelmente similar ao efeito produzidos pelos vários tipos de adjuvantes que são utilizados em imunizações, quer seja o alúmen ou emulsões lipídicas, que retêm o antígeno com uma suspensão de baixa solubilidade em um local, com uma intensa reação inflamatória com neutrófilos pelo dano local⁸². A radiólise da água induzida pela radiação funciona como uma "chuva" de energia, que promove os mesmos tipos de radicais que são produzidos pela mieloperoxidase e haletos⁹⁶, transformando a proteína sem adição de novas moléculas ou reações químicas drásticas¹²¹.

A seleção natural é um fenômeno complexo que tem o tempo a seu favor, mas também sabe utilizar todos os sistemas disponíveis para o fim desejado. A utilização da via endocítica do CD36 para uma melhor apresentação de antígeno é um destes exemplos. Neste trabalho, utilizamos diferentes ferramentas para provar a participação destes receptores e medimos a imunidade produzida com diferente abordagens e fins, mas o mais impressionante é o relativo pequeno número de personagens em nosso quadro, tão diverso de antígenos e imunógenos. Assim, a criação de um radical oxidativo inesperado em uma grande molécula faz com que ela se ligue a um receptor multiespecífico de afinidades lipídicas, bloqueando seu túnel de transporte e portanto se ligando a um receptor que tem um transporte intracelular sem proteólise, adentrando um sistema onde a proteólise controlada possa ocorrer e ao mesmo tempo está ocorrendo a síntese e montagem da molécula de apresentação

180

já com o peptídeo que foi clivado e não contem o radical que serviu para seu transporte para dentro da célula. É uma perfeita camuflagem de toda a reação. A resposta induzida é contra um antígeno que não contem o radical de internalização, portanto não permite descobrir seu receptor, que é transportado por um sistema de vesículas sem marcadores clássicos como clatrina e caveolinas e a proteólise ocorre em um segmento não especializado da célula, distante dos lisossomos clássicos. Por ser mais econômico, acreditamos que esta etapa possa estar ocorrendo.

7 CONCLUSÕES

7.1 Geral

O uso da radiação ionizante em extratos antigênicos de *T. gondii permitiu* a construção de um imunógeno acelular eficiente para a proteção de camundongos contra a infecção após o desafio com cepas viáveis, por dirigir o antígeno para receptores CD36 em células apresentadoras de antígenos na resposta imune adaptativa semelhante a doença usual.

7.1.1 Específicas

- A radiação ionizante promove alterações mínimas nas estruturas primárias dos STag com características de dose resposta, afetando um máximo de 60% das proteínas presentes no extrato, mas com manutenção das características antigênicas e imunogênicas;
- b. O STag 1500Gy foi mais eficiente que o nativo na indução de imunidade, em especial quando utilizamos uma massa de 10µg de proteína/animal, com maiores índices de IgG e melhor maturação de anticorpos em comparação ao antígeno nativo ou taquizoítos íntegros irradiados, porém com diferença da proporção de linfócitos CD8⁺ que foi maior na imunização com taquizoítos íntegros irradiados;
- c. A proteção induzida após o desafio com cepas viáveis de *T. gondii* em animais imunizados com STag 1500Gy foi semelhante a induzida por taquizoítos íntegros irradiados e ambas maiores que as induzidas pela imunização com STag nativo;

- Após o acoplamento utilizando diferentes marcadores não oxidativos foi possível demonstrar que o STag 1500Gy apresenta uma cinética de captação em macrófagos, maior e mais duradoura que a do STag nativo;
- e. A captação do STag 1500Gy foi mais afetada por inibidores de radicais oxidados (Probucol) do que por inibidores de radicais negativos (Dextransulfato);
- f. O STag 1500Gy apresentou a mesma sensibilidade às peptidases que o STag nativo;
- g. A captação e a cinética do STag 1500Gy em macrófagos peritoneais de camundongos CD36^{-/-} foi inversamente proporcional a observada em macrófagos normais, sendo o STag nativo o que apresentou maior ligação nas células. Efeito observado também por citometria;
- Animais CD36^{-/-} não foram passiveis de imunização, sem produção significante de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e altamente suscetíveis a infecção pós-desafio;
- O transplante de macrófagos peritoneais de camundongos normais (CD36^{+/+})
 "primados" com STag 1500Gy para animais CD36^{-/-} resultou na produção de anticorpos IgG nos animais receptores.

REFERÊNCIAS

- 1. Dubey JP. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan Perspectives and Methods: Second Edition. Academic Press; 2013. p. 1–17.
- 2. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical Microbiology Reviews. 1998;11(2):267–99.
- 3. Robinson S a., Smith JE, Millner P a. *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): in vitro analysis of host cell binding. Parasitology. 2004;128(4):391–6.
- Kasper LH, Buzoni-Gatel D. Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. Parasitology today (Personal ed). 1998;14(4):150–6.
- 5. Hampton MM. Congenital Toxoplasmosis: A Review. Neonatal network : NN. 2015;34(5):274–8.
- Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. Parasitology research. 2010;107(2):253– 60.
- 7. Buchholz KR, Bowyer PW, Boothroyd JC. Bradyzoite pseudokinase 1 is crucial for efficient oral infectivity of the *Toxoplasma gondii* tissue cyst. Eukaryotic cell. 2013;12(3):399–410.
- 8. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clinical microbiology reviews. 2012;25(2):264–96.
- 9. Meerburg BG, Kijlstra A. Changing climate-changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe. Parasitology research. 2009;105(1):17–24.
- 10. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2000;64(3):607–23.
- 11. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nature Reviews Microbiology. 2012;10(11):766–78.
- 12. Freppel W, Ferguson DJP, Shapiro K, Dubey JP, Puech P-H, Dumètre A. Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. The Cell Surface. 2018;100016.

- 13. Sullivan WJ, Jeffers V, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. FEMS microbiology reviews. 2012;36(3):717–33.
- 14. Rostami A, Riahi SM, Fakhri Y, Saber V, Hanifehpour H, Valizadeh S, et al. The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among wild boars: A systematic review and meta-analysis. Veterinary Parasitology. 2017;244:12–20.
- 15. Santo AH, Pinheiro CE, Jordani MS. [Aids as underlying and associated causes of death, State of S. Paulo, Brazil, 1998]. Revista de saude publica. 2000;34(6):581–8.
- 16. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. Fernandez-Reyes D, editor. PloS one. 2014 Mar;9(3):e90203.
- 17. Sobral CA, Amendoeira MRR, Teva A, Patel BN, Klein CH. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2005;72(1):37–41.
- 18. Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FR de A, Souza Júnior VG de, Botelho CA, Figueiredo MS, et al. Toxoplasmose aguda: estudo da freqüência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos maternofetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2005;27(8):442–9.
- 19. Capobiango JD, Mitsuka Breganó R, Navarro IT, Rezende Neto CP, Barbante Casella AM, Ruiz Lopes Mori FM, et al. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2014;18(4):364–71.
- 20. Lopes FMR, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2007;11(5):496–506.
- 21. McAuley JB. Congenital Toxoplasmosis. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society. 2014 Sep;3 Suppl 1(Suppl 1):S30-5.
- 22. Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. Handbook of clinical neurology. 2013;114:125–45.

- 23. Jones JL, Parise ME, Fiore AE. Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2014;90(5):794–9.
- Guimarães ACS, Kawarabayashi M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade Jr. HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1993;35(6):479–83.
- 25. Wang Z-D, Liu H-H, Ma Z-X, Ma H-Y, Li Z-Y, Yang Z-B, et al. *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. Frontiers in microbiology. 2017;8:389.
- 26. Basavaraju A. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. Tropical parasitology. 2016;6(2):129–35.
- 27. Luma HN, Tchaleu BCN, Mapoure YN, Temfack E, Doualla MS, Halle MP, et al. Toxoplasma encephalitis in HIV/AIDS patients admitted to the Douala general hospital between 2004 and 2009: a cross sectional study. BMC research notes. 2013;6:146.
- 28. Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology. 1995;110 Suppl:S11-6.
- 29. Abu-Dalbouh MA, Ababneh MM, Giadinis ND, Lafi SQ. Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. Tropical Animal Health and Production. 2012;44(1):49–54.
- 30. Olinda RG, Pena HFJ, Frade MTS, Ferreira JS, Maia LÂ, Gennari SM, et al. Acute toxoplasmosis in pigs in Brazil caused by Toxoplasma gondii genotype Chinese 1. Parasitology Research. 2016;115(7):2561–6.
- Meireles LR, Galisteo Jr. AJ, Andrade Jr. HF de. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2003;40(4):267– 71.
- 32. Tenter a M, Heckeroth a R, Weiss LM. *Toxoplasma gondii:* from animals to humans. International journal for parasitology. 2000;30(12–13):1217–58.
- 33. Sweeney KR, Morrissette NS, LaChapelle S, Blader IJ. Host cell invasion by Toxoplasma gondii is temporally regulated by the host microtubule cytoskeleton. Eukaryotic cell. 2010 Nov;9(11):1680–9.

- 34. Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. International journal for parasitology. 2001;31(12):1293–302.
- 35. Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. Current opinion in microbiology. 2007;10(6):582–7.
- 36. David Sibley L. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Immunological Reviews. 2011;240(1):72–91.
- 37. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Seminars in immunopathology. 2012;34(6):793–813.
- 38. Tait ED, Hunter CA. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(2):201–10.
- Mashayekhi M, Sandau MM, Dunay IR, Frickel EM, Khan A, Goldszmid RS, et al. CD8α(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Immunity. 2011;35(2):249–59.
- 40. Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. In 2013. p. 125–45.
- 41. Pifer R, Yarovinsky F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. Trends in parasitology. 2011;27(9):388–93.
- 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. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1991;146(1):286–92.
- 43. Butcher BA, Kim L, Johnson PF, Denkers EY. Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2001;167(4):2193–201.
- 44. Rodrigues MM, Boscardin SB, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Salay G, Soares IS. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2003;75(4):443–68.

- 45. Abou-Bacar A, Pfaff AW, Georges S, Letscher-Bru V, Filisetti D, Villard O, et al. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. Infection and immunity. 2004;72(3):1397–401.
- 46. Kang H, Remington JS, Suzuki Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2000;164(5):2629–34.
- 47. 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. Infection and immunity. 1998;66(9):4503–6.
- 48. Halonen SK, Taylor GA, Weiss LM. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. Infection and immunity. 2001;69(9):5573–6.
- 49. Buxton D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. Parasitology today (Personal ed). 1993;9(9):335–7.
- 50. Innes EA, Bartley PM, Maley S, Katzer F, Buxton D. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(2):246–51.
- 51. Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Förster-Waldl E, Petersen E. Vaccines against *Toxoplasma gondii:* challenges and opportunities. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(2):252–66.
- 52. Petersen E, Nielsen H V, 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;16(13):1283–9.
- 53. Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1991;147(10):3501–6.
- 54. Mishima M, Xuan X, Nishikawa Y, Makala L, Yokoyama N, Nagasawa H, et al. Construction of recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* surface antigen 1. Molecular and biochemical parasitology. 2001;117(1):103–6.

- 55. Liu Q, Singla L Das, Zhou H. Vaccines against *Toxoplasma gondii:* status, challenges and future directions. Human vaccines & immunotherapeutics. 2012 Sep;8(9):1305–8.
- 56. Dubey JP, Brake RJ, Murrell KD, Fayer R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. American journal of veterinary research. 1986 Mar;47(3):518–22.
- 57. Dubey JP, Jenkins MC, Thayer DW, Kwok OC, Shen SK. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. The Journal of parasitology. 1996;82(5):724–7.
- 58. Hiramoto RM, Galisteo AJ, do Nascimento N, de Andrade HF. 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.
- 59. Orjih AU, Nussenzweig RS. Immunization against rodent malaria with cryopreserved irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1980;29(3):343–7.
- 60. Zorgi NE, Costa A, Galisteo AJ, do Nascimento N, De Andrade HF. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. Immunology Letters. 2011;
- 61. Zorgi NE, Galisteo AJ, Sato MN, do Nascimento N, de Andrade HF. Immunity in the spleen and blood of mice immunized with irradiated *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Medical Microbiology and Immunology. 2016 Aug;205(4):297–314.
- 62. Li Y, Wang Z, Liu X, Tang J, Peng B, Wei Y. X-ray Irradiated Vaccine Confers protection against Pneumonia caused by *Pseudomonas Aeruginosa*. Scientific Reports. 2016;6(1):18823.
- 63. Burnside K, Lembo A, Harrell MI, Klein JA, Lopez-Guisa J, Siegesmund AM, et al. Vaccination with a UV-irradiated genetically attenuated mutant of *Staphylococcus aureus* provides protection against subsequent systemic infection. The Journal of infectious diseases. 2012 Dec;206(11):1734–44.

- 64. Pinho JR, Cardi BA, Andrade HF, Barr PJ, Bathurst IC, Vicente EJ, et al. Immunogenic properties of the M. leprae recombinant 18-kDa antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association. 1995;63(3):381–90.
- Do Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology. 1996 Jan;34(1):123–31.
- 66. Kusel JR, Wales A, Vieira L, Wu K-Y, Kusel JR, Wales A, et al. Effects of irradiation and tunicamycin on the surface glycoproteins *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1989;84(suppl 1):199–208.
- 67. Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics. 2001;1504(2–3):196–219.
- 68. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. Antioxidants & redox signaling. 2014;21(2):260–92.
- 69. Antunes CM, Katz N, de Andrade RM, Mansur Neto E, Lima JM. Study of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 13(6):383–6.
- 70. Richter D, Harn DA, Matuschka FR. The irradiated cercariae vaccine model: looking on the bright side of radiation. Parasitology today. 1995;11(8):288–93.
- 71. Cole GT, Hurtgen BJ, Hung C-Y. Progress Toward a Human Vaccine Against Coccidioidomycosis. Current fungal infection reports. 2012;6(4):235–44.
- 72. Jenkins MC. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. Veterinary parasitology. 2001;101(3–4):291–310.
- 73. Lightowlers MW. Vaccination against animal parasites. Veterinary parasitology. 1994;54(1–3):177–204.
- 74. Wacker MA, Turnbull LB, Walker LA, Mount MC, Ferdig MT. Quantification of multiple infections of *Plasmodium falciparum in vitro*. Malaria Journal. 2012 May 30;11(1):180.

- 75. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. The Journal of experimental biology. 2003;206(Pt 21):3803–8.
- 76. Hoffman SL, Goh LML, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, et al. Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. The Journal of Infectious Diseases. 2002;185(8):1155–64.
- 77. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. Nature. 1967;216(5111):160–2.
- Hansen R, DeSilva S, Strickland GT. Antisporozoite antibodies in mice immunized with irradiation-attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1979;73(5):574–8.
- 79. Gilbert JM, Fuller AL, Scott TC, McDougald LR. Biological effects of gammairradiation on laboratory and field isolates of *Eimeria tenella* (Protozoa; Coccidia). Parasitology research. 1998 Jun;84(6):437–41.
- Richter D, Harn DA, Matuschka FR. The irradiated cercariae vaccine model: looking on the bright side of radiation. Parasitology today (Personal ed). 1995;11(8):288–93.
- Cardi BA, Nascimento N, Andrade HF. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with 60Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. International journal of radiation biology. 1998; 73(5):557–64.
- 82. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. Frontiers in immunology. 2013;4:114.
- 83. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. The Journal of clinical investigation. 2016;126(3):799–808.
- 84. Brito LA, Malyala P, O'Hagan DT. Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. Seminars in Immunology. 2013;25(2):130–45.
- 85. Hughes CE, Benson RA, Bedaj M, Maffia P. Antigen-Presenting Cells and Antigen Presentation in Tertiary Lymphoid Organs. Frontiers in immunology. 2016;7:481.

- 86. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. Immunity. 2010;33(4):492–503.
- 87. Kamphorst AO, Araki K, Ahmed R. Beyond adjuvants: immunomodulation strategies to enhance T cell immunity. Vaccine. 2015;33 Suppl 2(0 2):B21-8.
- Pérez O, Batista-Duharte A, González E, Zayas C, Balboa J, Cuello M, et al. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2012;45(8):681–92.
- 89. De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. Frontiers in immunology. 2013;4:214.
- B. Cvjetanovic KU. The present status of field and laboratory studies of Typhoid and Paratyphoid vaccines with special reference to studies sponsored by World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization. 1965;32(1):29–36.
- 91. Wang TT, Tan GS, Hai R, Pica N, Ngai L, Ekiert DC, et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(44):18979–84.
- Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. Vaccine. 2012;30(13):2256–72.
- 93. O'Hagan DT, Rahman D, McGee JP, Jeffery H, Davies MC, Williams P, et al. Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems. Immunology. 1991;73(2):239–42.
- 94. 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.
- 95. Fox CB, Kramer RM, Barnes V L, Dowling QM, Vedvick TS. Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants. Therapeutic Advances in Vaccines. 2013;1(1):7–20.

- 96. Biedroń R, Konopiński MK, Marcinkiewicz J, Józefowski S. Oxidation by Neutrophils-Derived HOCI Increases Immunogenicity of Proteins by Converting Them into Ligands of Several Endocytic Receptors Involved in Antigen Uptake by Dendritic Cells and Macrophages. Haziot A, editor. PLOS ONE. 2015;10(4):e0123293.
- 97. Mohan T, Verma P, Rao DN. Novel adjuvants & amp; delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. The Indian journal of medical research. 2013;138(5):779–95.
- 98. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. Nature immunology. 2011;12(6):509–17.
- 99. Wichmann O, Vannice K, Asturias EJ, de Albuquerque Luna EJ, Longini I, Lopez AL, et al. Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness. Vaccine. 2017;35(42):5535–42.
- 100. Plotkin SA. Vaccines: Correlates of Vaccine-Induced Immunity. Clinical Infectious Diseases. 2008 Aug 1;47(3):401–9.
- 101. Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. Virology. 2015;479–480:379–92.
- 102. Zarei AE, Almehdar HA, Redwan EM. Hib Vaccines: Past, Present, and Future Perspectives. Journal of immunology research. 2016;2016:7203587.
- 103. Jaurigue JA, Seeberger PH. Parasite Carbohydrate Vaccines. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017;7:248.
- 104. Chaplin DD. Overview of the immune response. The Journal of allergy and clinical immunology. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
- 105. Furman D, Davis MM. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. Vaccine. 2015;33(40):5271–81.
- 106. Chan J, Mehta S, Bharrhan S, Chen Y, Achkar JM, Casadevall A, et al. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Seminars in immunology. 2014;26(6):588–600.
- 107. Pasetti MF, Simon JK, Sztein MB, Levine MM. Immunology of gut mucosal vaccines. Immunological reviews. 2011;239(1):125–48.

- 108. Gilbert SC. T-cell-inducing vaccines what's the future. Immunology. 2012;135(1):19–26.
- 109. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. Annual review of immunology. 2013;31:443–73.
- 110. Chorny A, Puga I, Cerutti A. Regulation of frontline antibody responses by innate immune signals. Immunologic research. 2012;54(1–3):4–13.
- 111. Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. Immunology. 2009;126(2):165–76.
- 112. Klasse PJ. How to assess the binding strength of antibodies elicited by vaccination against HIV and other viruses. Expert review of vaccines. 2016;15(3):295–311.
- 113. Eisen HN. Affinity Enhancement of Antibodies: How Low-Affinity Antibodies Produced Early in Immune Responses Are Followed by High-Affinity Antibodies Later and in Memory B-Cell Responses. Cancer Immunology Research. 2014; 2(5):381–92.
- 114. Brode S, Macary PA. Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! Immunology. 2004;112(3):345–51.
- 115. Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules *in vitro* and *in vivo*: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. Advances in immunology. 1999;73:1–77.
- 116. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, et al. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. The Journal of experimental medicine. 1999 Jan 18;189(2):371–80.
- 117. Shakushiro K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y. Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells. Immunology. 2004;112(2):211–8.
- 118. Cifarelli V, Ivanov S, Xie Y, Son N-H, Saunders BT, Pietka TA, et al. CD36 deficiency impairs the small intestinal barrier and induces subclinical inflammation in mice. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. 2017;3(1):82–98.

- 119. Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. Journal of lipid research. 2009;50 Suppl(Suppl):S282-6.
- 120. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979;76(7):3330–7.
- 121. Zeng Y, Tao N, Chung K-N, Heuser JE, Lublin DM. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. The Journal of biological chemistry. 2003;278(46):45931–6.
- 122. Neyen C. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. Immunobiology. 2012; 217(5):492–502.
- 123. Linehan SA, Martinez-Pomares L, Gordon S. Mannose Receptor and Scavenger Receptor: Two Macrophage Pattern Recognition Receptors with Diverse Functions in Tissue Homeostasis and Host Defense. In: The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 1–14.
- 124. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko A V., Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. Journal of Molecular Medicine. 2017;95(11):1153–65.
- 125. Gough PJ, Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. Microbes and infection. 2000;2(3):305–11.
- 126. Hamasaki S, Kobori T, Yamazaki Y, Kitaura A, Niwa A, Nishinaka T, et al. Effects of scavenger receptors-1 class A stimulation on macrophage morphology and highly modified advanced glycation end product-protein phagocytosis. Scientific Reports. 2018;8(1):5901.
- 127. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. The Journal of experimental medicine. 1998;188(7):1359–68.
- 128. Belz GT, Vremec D, Febbraio M, Corcoran L, Shortman K, Carbone FR, et al. CD36 is differentially expressed by CD8+ splenic dendritic cells but is not required for cross-presentation in vivo. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2002 Jun;168(12):6066–70.

- Gonzalez S, González-Rodríguez AP, Suárez-Álvarez B, López-Soto A, Huergo-Zapico L, Lopez-Larrea C. Conceptual aspects of self and nonself discrimination. Self/nonself. 2011;2(1):19–25.
- 130. Levy-Barazany H, Frenkel D. Expression of scavenger receptor A on antigen presenting cells is important for CD4+ T-cells proliferation in EAE mouse model. Journal of neuroinflammation. 2012;9(1):120.
- 131. Fukasawa M, Adachi H, Hirota K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. SRB1, a Class B Scavenger Receptor, Recognizes both Negatively Charged Liposomes and Apoptotic Cells. Experimental Cell Research. 1996;222(1):246–50.
- 132. Wahe A, Kasmapour B, Schmaderer C, Liebl D, Sandhoff K, Nykjaer A, et al. Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. Journal of Cell Science. 2010;123(14):2502–11.
- 133. ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013;5(12):a016873.
- 134. Galletta BJ, Cooper JA. Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. Current opinion in cell biology. 2009;21(1):20–7.
- 135. Staudt C, Puissant E, Boonen M. Subcellular Trafficking of Mammalian Lysosomal Proteins: An Extended View. International journal of molecular sciences. 2016 Dec;18(1).
- 136. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2009;20(2):72–7.
- 137. Zhou D, Blum JS. Presentation of Cytosolic Antigens Via MHC Class II Molecules. Immunologic Research. 2004;30(3):279–90.
- 138. Patel HH, Insel PA. Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. Antioxidants & redox signaling. 2009;11(6):1357–72.
- Catalgol B, Kartal Ozer N. Lipid rafts and redox regulation of cellular signaling in cholesterol induced atherosclerosis. Current cardiology reviews. 2010 Nov;6(4):309–24.

- 140. Pepino MY, Kuda O, Samovski D, Abumrad NA. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. Annual review of nutrition. 2014;34:281–303.
- 141. Prabhudas M, Bowdish D, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, et al. Standardizing scavenger receptor nomenclature. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2014;192(5):1997–2006.
- 142. Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. Immunological reviews. 2014;262(1):36–55.
- 143. Cardi BA, Andrade HF, Rogero JR, Nascimento N. Differential biodistribution of native and 2 kGy 60Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. Natural toxins. 1998;6(1):19–25.
- 144. Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press; 1996. 125 p.
- 145. Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infection and immunity. 1978;21(1):55–8.
- 146. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680–5.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979;76(9):4350–4.
- 148. Frenchik MD, Tsonev LI, McFaul SJ. A microplate assay for the determination of hemoglobin concentration. Clinica Chimica Acta. 2004;339(1–2):199–201.
- Moon S, Song K Bin. Effect of γ-irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. Food Chemistry. 2001;74(4):479–83.
- 150. da Costa A, Zorgi NE, do Nascimento N, Galisteo AJ, de Andrade HF. Gamma irradiation of *Toxoplasma gondii* protein extract improve immune response and protection in mice models. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018;106:599–604.

- 151. Do Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology. 1996;34(1):123–31.
- 152. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in microbiology. 2015;6:791.
- 153. Michaels HB, Hunt JW. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. Radiation research. 1978;74(1):23–34.
- 154. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 2015;8(2):247–54.
- 155. Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee S Bin, Kim K, Saha SK, Yang G-M, et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. International journal of molecular sciences. 2017;18(1).
- 156. Kim M-J, Lee J-W, Sung N-Y, Kim S-M, Hwang Y-J, Kim J-H, et al. Comparison Study on Changes of Antigenicities of Egg Ovalbumin Irradiated by Electron Beam or X-Ray. Korean journal for food science of animal resources. 2014;34(5):570–5.
- 157. Kim M-J, Lee J-W, Yook H-S, Lee S-Y, Kim M-C, Byun M-W. Changes in the antigenic and immunoglobulin E-binding properties of hen's egg albumin with the combination of heat and gamma irradiation treatment. Journal of food protection. 2002;65(7):1192–5.
- 158. Ferreira Junior RS, Nascimento N, Martinez JC, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. Immunization with native and cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom in swiss mice: assessment of the neutralizing potency of antisera. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2005;11(3):299–314.
- 159. Chan TD, Brink R. Affinity-based selection and the germinal center response. Immunological Reviews. 2012;247(1):11–23.
- 160. Linterman MA, Vinuesa CG. T Follicular Helper Cells During Immunity and Tolerance. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2010;92:207–48.

- 161. Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo M-G. CD4+ regulatory T cells: Mechanisms of induction and effector function. Autoimmunity Reviews. 2005;4(8):491–6.
- 162. Klein L, Robey EA, Hsieh C-S. Central CD4+ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. Nature reviews Immunology. 2019;19(1):7–18.
- 163. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. Nature Reviews Immunology. 2017;17(5):281–94.
- 164. Weiss A, Irving BA, Tan LK, Koretzky GA. Signal transduction by the T cell antigen receptor. Seminars in immunology. 1991;3(5):313–24.
- 165. Casciotti L, Ely KH, Williams ME, Khan IA. CD8(+)-T-cell immunity against Toxoplasma gondii can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells. Infection and immunity. 2002;70(2):434–43.
- 166. GUITON R, ZAGANI R, DIMIER-POISSON I. Major role for CD8 + T cells in the protection against Toxoplasma gondii following dendritic cell vaccination. Parasite Immunology. 2009;31(10):631–40.
- 167. Guiton R, Zagani R, Dimier, I. Major role for CD8 + T cells in the protection against Toxoplasma gondii following dendritic cell vaccination. Parasite Immunology. 2009;31(10):631–40.
- 168. Liu Y, Cao A, Li Y, Li X, Cong H, He S, et al. Immunization with a DNA vaccine encoding Toxoplasma gondii Superoxide dismutase (TgSOD) induces partial immune protection against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. BMC infectious diseases. 2017;17(1):403.
- 169. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Immunology and Cell Biology. 2004 Oct;82(5):488–96.
- 170. Booth KS, James ER, Popiel I. Cryopreservation of an Attenuated Vaccine Strain of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. Cryobiology. 1996;33(3):330–7.
- 171. Pernas L, Bean C, Boothroyd JC, Scorrano L. Mitochondria Restrict Growth of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* by Limiting Its Uptake of Fatty Acids. Cell Metabolism. 2018;27(4):886-897.e4.

- 172. Dupont CD, Christian DA, Selleck EM, Pepper M, Leney-Greene M, Harms Pritchard G, et al. Parasite fate and involvement of infected cells in the induction of CD4+ and CD8+ T cell responses to *Toxoplasma gondii*. PLoS pathogens. 2014;10(4):e1004047.
- 173. Bansal P, Mukherjee P, Basu SK. Receptors Maleylated Protein Binding to Scavenger MHC Class I-Restricted Presentation of George, Vineeta Bal and Satyajit Rath. Vol. 4430, J Immunol References. 1999.
- 174. Mack DG, McLeod R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces T. gondii infection of enterocytes in vitro. Journal of Clinical Investigation. 1992;90(6):2585–92.
- 175. Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. Chemical science. 2016 Feb;7(2):842–54.
- 176. Hussain AA, Jona JA, Yamada A, Dittert LW. Chloramine-T in Radiolabeling Techniques II. A Nondestructive Method for Radiolabeling Biomolecules by Halogenation. Analytical Biochemistry. 1995;224(1):221–6.
- 177. Gupta S, Batra S, Jain M. Antibody labeling with radioiodine and radiometals. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2014;1141:147–57.
- 178. Martín-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. Immunology. 2001;103(1):41–8.
- 179. Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. Traffic (Copenhagen, Denmark). 2013;14(2):135–52.
- 180. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas. 2012;45(12):1102–11.
- 181. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. The Journal of Cell Biology. 2010;191(3):677–91.
- 182. Hyoung Park J, Sin Lim M, Rang Woo J, Won Kim J, Min Lee G. The molecular weight and concentration of dextran sulfate affect cell growth and antibody production in CHO cell cultures. Biotechnology Progress. 2016;32(5):1113–22.

- 183. Toledo-Ibelles P, Mas-Oliva J. Antioxidants in the Fight Against Atherosclerosis: Is This a Dead End? Current atherosclerosis reports. 2018;20(7):36.
- 184. Zhang Q, Chen L, Si Z, Bu H, Narasimhulu CA, Song X, et al. Probucol Protects Endothelial Progenitor Cells Against Oxidized Low-Density Lipoprotein via Suppression of Reactive Oxygen Species Formation In Vivo. Cellular Physiology and Biochemistry. 2016;39(1):89–101.
- 185. Antoniou AN, Blackwood SL, Mazzeo D, Watts C. Control of antigen presentation by a single protease cleavage site. Immunity. 2000;12(4):391–8.
- Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Nature Reviews Immunology. 2015;15(4):203– 16.
- Alarcón B, Mestre D, Martínez-Martín N. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? Immunology. 2011;133(4):420– 5.
- 188. Riedhammer C, Weissert R. Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. Frontiers in immunology. 2015;6:322.
- 189. Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, Watts C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. Immunity. 1995;3(6):783–91.
- 190. Malhotra S, Kovats S, Zhang W, Coggeshall KM. B Cell Antigen Receptor Endocytosis and Antigen Presentation to T Cells Require Vav and Dynamin. Journal of Biological Chemistry. 2009;284(36):24088–97.
- 191. Watts C. The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. Biochimica et biophysica acta. 2012;1824(1):14–21.
- 192. Bretou M, Kumari A, Malbec O, Moreau HD, Obino D, Pierobon P, et al. Dynamics of the membrane-cytoskeleton interface in MHC class II-restricted antigen presentation. Immunological Reviews. 2016;272(1):39–51.
- 193. Avalos AM, Ploegh HL. Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells. Frontiers in immunology. 2014;5:92.

- 194. Platt CD, Ma JK, Chalouni C, Ebersold M, Bou-Reslan H, Carano RAD, et al. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(9):4287–92.
- 195. Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, et al. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. The Journal of Cell Biology. 2002;158(6):1119–31.
- 196. Michael DR, Ashlin TG, Davies CS, Gallagher H, Stoneman TW, Buckley ML, et al. Differential regulation of macropinocytosis in macrophages by cytokines: implications for foam cell formation and atherosclerosis. Cytokine. 2013;64(1):357–61.
- 197. Zmysłowski A, Szterk A. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. Lipids in health and disease. 2017;16(1):188.
- 198. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. Science signaling. 2009;2(72):re3.
- 199. Ogden CA, DeCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. The Journal of experimental medicine. 2001;194(6):781–95.
- 200. Won W-J, Bachmann MF, Kearney JF. CD36 is differentially expressed on B cell subsets during development and in responses to antigen. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2008;180(1):230–7.
- 201. Hampel F, Ehrenberg S, Hojer C, Draeseke A, Marschall-Schroter G, Kuhn R, et al. CD19-independent instruction of murine marginal zone B-cell development by constitutive Notch2 signaling. Blood. 2011;118(24):6321–31.
- 202. Cruz-Leal Y, Machado Y, López-Requena A, Canet L, Laborde R, Alvares AM, et al. Role of B-1 cells in the immune response against an antigen encapsulated into phosphatidylcholine-containing liposomes. International Immunology. 2014;26(8):427–37.
- 203. Shibata K. Close link between development and function of gamma-delta T cells. Microbiology and Immunology. 2012;56(4):217–27.

- 204. Butcher BA, Denkers EY. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii to* inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. Infection and immunity. 2002;70(9):5216–24.
- 205. Ritz U, Seliger B. The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance. Molecular medicine (Cambridge, Mass). 2001;7(3):149–58.
- Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(22):9196–201.
- 207. Hale JS, Youngblood B, Latner DR, Mohammed AUR, Ye L, Akondy RS, et al. Distinct Memory CD4+ T Cells with Commitment to T Follicular Helper- and T Helper 1-Cell Lineages Are Generated after Acute Viral Infection. Immunity. 2013;38(4):805–17.
- 208. Sant AJ, McMichael A. Revealing the role of CD4(+) T cells in viral immunity. The Journal of experimental medicine. 2012;209(8):1391–5.
- 209. Johnson LL, Sayles PC. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. Infection and immunity. 2002;70(1):185–91.
- 210. Mailliard RB, Egawa S, Cai Q, Kalinska A, Bykovskaya SN, Lotze MT, et al. Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. The Journal of experimental medicine. 2002;195(4):473–83.
- 211. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology. 2011;11(12):823–36.
- 212. Paul WE, Grossman Z. Pathogen-sensing and regulatory T cells: integrated regulators of immune responses. Cancer immunology research. 2014;2(6):503–9.
- 213. Balasubramanian S, Kota SK, Kuchroo VK, Humphreys BD, Strom TB. TIM family proteins promote the lysosomal degradation of the nuclear receptor NUR77. Science signaling. 2012 Dec;5(254):ra90.

- 214. Li LX, Chen JX, Liao DF, Yu L. Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by reducing P-selectin synthesis *in vitro*. Endothelium : journal of endothelial cell research. 1998;6(1):1–8.
- 215. Demarquoy J, Le Borgne F. Crosstalk between mitochondria and peroxisomes. World journal of biological chemistry. 2015;6(4):301–9.
- 216. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps the dark side of neutrophils. The Journal of clinical investigation. 2016;126(5):1612–20.
- 217. Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. Redox Report. 1997;3(1):3–15.
- 218. Harvey BP, Quan TE, Rudenga BJ, Roman RM, Craft J, Mamula MJ. Editing antigen presentation: antigen transfer between human B lymphocytes and macrophages mediated by class A scavenger receptors. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2008;181(6):4043–51.
- 219. Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. Frontiers in Immunology. 2012;3:66.
- 220. Howie D, Ten Bokum A, Necula AS, Cobbold SP, Waldmann H. The Role of Lipid Metabolism in T Lymphocyte Differentiation and Survival. Frontiers in immunology. 2017;8:1949.
- 221. Schwake M, Schröder B, Saftig P. Lysosomal Membrane Proteins and Their Central Role in Physiology. Traffic. 2013 Jul;14(7):739–48.
- 222. Hsu VW, Yuan LC, Nuchtern JG, Lippincott-Schwartz J, Hammerling GJ, Klausner RD. A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules. Nature. 1991 Aug;352(6334):441–4.
- 223. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. BioMed research international. 2017;2017:9042851.
- 224. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nature immunology. 2015;16(4):343–53.

225. El-Sayed A, Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrindependent to lipid raft-mediated endocytosis. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2013;21(6):1118–30.