

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Papel de HSP70 de *Toxoplasma gondii* como antígeno vacinal e como  
ferramenta diagnóstica de toxoplasmose em camundongos BALB/c e  
C57BL/6**

Paulo Victor Czarnewski Barenco

Uberlândia  
Fevereiro 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Papel de HSP70 de *Toxoplasma gondii* como antígeno vacinal e como  
ferramenta diagnóstica de toxoplasmose em camundongos BALB/c e  
C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como requisito  
parcial a obtenção do título de Mestre

Paulo Victor Czarnewski Barenco

Dr.<sup>a</sup> Neide Maria da Silva

Uberlândia  
Fevereiro 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

B248p Barenco, Paulo Victor Czarnewski, 1991-  
2013      Papel de HSP70 de *Toxoplasma gondii* como antígeno vacinal e como  
ferramenta diagnóstica de toxoplasmose em camundongos BALB/c e  
C57BL/6 / Paulo Victor Czarnewski Barenco. – 2013.  
80 f. : il.

Orientadora: Neide Maria da Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-  
ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Toxoplasmo-  
se - Diagnóstico - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II. Universidade Fede-  
ral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasi-  
tologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 612.017

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Rosemarie Czarnewski**, por todo apoio durante minha vida. Foi você quem me criou o gosto pelo estudo desde pequeno antes mesmo de entrar na escola. Passando por dificuldade, mas se esforçando para dar o melhor para mim e meu irmão. Obrigado pelo exemplo de ética e honestidade e pelo amor incondicional.

Tudo isso resultou no que eu sou hoje. Te amo muito!

## PENSAMENTO

*“O segredo do sucesso não é fazer o que se gosta, mas sim gostar do que se faz.”*

(Cecília Meireles)

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dr.<sup>a</sup> Neide Maria da Silva**, por todos os ensinamentos e conhecimentos adquiridos durante esses quatro anos de convívio desde minha entrada no laboratório, aprovação no mestrado e no doutorado até o presente momento. Gostaria que soubesse também que muitas das filosofias que cultivo e regem parte de minha vida atual foram originadas da nossa amizade. A você devo um imenso Muito Obrigado!

À pessoa que me convidou para fazer estágio no laboratório durante a graduação, **Dr.<sup>a</sup> Eloísa Amália Vieira Ferro**, por ter acreditado no meu potencial. Foi ela quem me disse a frase descrita como pensamento desta dissertação nos primeiros dias de estágio, e a sigo até hoje.  
Muito Obrigado!

Ao **Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior**, por todos os ensinamentos sobre purificação de proteínas recombinantes, SDS-PAGEs, e biologia molecular neste tempo de convívio. Muito Obrigado!

À **Dr.<sup>a</sup> Deise Aparecida de Oliveira Silva** por todas as sugestões para o trabalho e os ensinamentos durante os “milhares” ELISAs. Muito Obrigado!

Ao **Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo** pelas ideias e sugestões na produção de anticorpos IgY e nas reações de imunofluorescência. Muito Obrigado!

Ao **Dr. José Roberto Mineo** e à **Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Roque Barreira** pelas grandes contribuições no âmbito intelectual do trabalho. Muito Obrigado!

Às minhas irmãs de laboratório, **Ester Cristina** e **Loyane Bertagnolli**, as quais sempre estiveram dispostas a me ajudar nos experimentos bem como nas imunohistoquímicas da vida.  
Muito obrigado pela amizade de vocês!

À **Karine Cristine** pela companhia neste tempo que passamos juntos no laboratório nas reações qPCRs e nos *immunblottings*. Obrigado!

Ao **Mário César** e à **Poliana Melo** pela companhia. Colocar ração, trocar a água e limpar o criadouro 3 a 4 vezes por semana bem como purificar as várias amostras de IgY ficaram mais fáceis com a ajuda de vocês. Obrigado!

Ao **Rômulo de Sousa, Layane Alencar, Luciana Alves e Alexsandra Bezerra** pela companhia e pela amizade e ajuda nos experimentos.

Às amigas, **Angélica Gomes, Bellisa de Freitas, Mariana Bodini e Letícia Felice** pela amizade e personalidades únicas que me fazem espelhar um pouco cada uma de vocês.  
Obrigado!

À **Pâmela, Mayara, Janice, Priscila e Rosiane** pelo convívio e pela amizade durante todos esses anos.

Aos amigos da genética, **Washington, Patrícia e Paula**, pela amizade e pelos ensinamentos quanto ao desenho de primers para qPCR e padronização das reações.

Aos técnicos do laboratório, **Eliete, Fabrício, Jucélia e Mariane** pela companhia e dedicação que permitiram o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus “mais-que-amigos” **Daniel Ferreira, Stephannie Assenheimer e Donizete Carvalho** por todo apoio durante esta etapa da minha vida.

À **FAPEMIG, CAPES e CNPq** pelo apoio financeiro!

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório de animais homeotérmicos que expressa a proteína de choque térmico de 70 kDa (TgHSP70) durante a conversão de estágios. TgHSP70 é uma proteína com elevado potencial antigênico e sua presença no curso da infecção é um sinal de perigo para o hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da TgHSP70 como ferramenta alternativa para o diagnóstico de toxoplasmose ativa, detectando a proteína, anticorpos específicos e complexos imunes (CI) circulantes em infecção experimental pelo parasita. Além disso, avaliamos a localização da proteína em taquizoítas de *T. gondii* e o papel dessa como antígeno vacinal. Deste modo, TgHSP70 recombinante foi purificada de *E. coli* e foi utilizada na imunização de galinhas e *Calomys callosus* para produção de anticorpos específicos anti-TgHSP70. Foi observado por imunofluorescência que TgHSP70 está presente no citoplasma de taquizoítas e que esta pode estar associada com a membrana plasmática interna, sendo demonstrado por *immunoblotting* e ELISA que TgHSP70 não é secretada por *T. gondii*. A imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com TgHSP70 apenas, não induziu proteção quando esses animais foram desafiados 30 dias após com as cepas RH ou ME-49 de *T. gondii*. Foi observado também que células de baço de animais não imunizados proliferam *in vitro* quando estimuladas com TgHSP70. Além disso, para verificar a presença de reativação da toxoplasmose, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* e tratados com dexametazona (DXM). Foi observado que animais C57BL/6 tratados com DXM apresentaram carga parasitária e alterações histológicas no cérebro aumentadas em relação aos camundongos BALB/c tratados, embora a inflamação tenha sido menor em ambas as linhagens quando comparado aos animais infectados e não tratados. Detectamos também por qPCR que a infecção induziu a expressão de TgHSP70 no cérebro dos animais, sendo maior no órgão dos camundongos C57BL/6, e também aumentou a concentração de TgHSP70 circulante no soro de ambas as linhagens e maior indução de anticorpos específicos e formação de CI em camundongos BALB/c. Por fim, estes dados sugerem que TgHSP70 circulante pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica de infecção ativa em camundongos C57BL/6, sendo que essa infecção é persistente nesses animais e que a TgHSP70, por outro lado, poderia ser utilizada como adjuvante em experimentos de imunização.

**Palavras-chave:** Camundongos BALB/c e C57BL/6, dexametazona, IgY, imunização, TgHSP70, *Toxoplasma gondii*.



## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite of warm-blooded animals that can express the heat shock protein of 70 kDa (*TgHSP70*) during stage conversion. *TgHSP70* is a highly antigenic protein and its presence indicates a danger signal to the host. The aim of this work was to verify the role of *TgHSP70* as an alternative tool for active toxoplasmosis diagnosis, detecting the protein, specific antibodies and immune complexes (IC) in the experimental infection with *T. gondii*. Also, we observed the localization of this protein in *T. gondii* tachyzoites and its role in immunization procedures. Recombinant *TgHSP70* was purified from *E. coli* and used to immunize chickens and *Calomys callosus* in order to produce specific antibodies anti-*TgHSP70*. It was observed by immunofluorescence that *TgHSP70* is present in the cytoplasm of tachyzoites and could be associated to the inner layer of plasma membrane. It was also demonstrated by immunoblotting and ELISA that this protein is not secreted by *T. gondii*. Immunization of BALB/c and C57BL/6 mice only with *TgHSP70* did not induce protection to challenge with ME-49 and RH strains of *T. gondii* after 30 of the last immunization. However, it was observed that spleen cells of non-immunized mice proliferate when stimulated in vitro with *TgHSP70*, indicating unspecific stimulation effect. Moreover, BALB/c and C57BL/6 mice were infected with *T. gondii* ME-49 strain and treated with dexamethasone (DXM) for toxoplasmosis reactivation. C57BL/6 mice treated with DXM presented higher parasite load in the brain than treated BALB/c mice. In addition, the treatment reduced the inflammatory changes in the brain of both lineages, although, these lesions were higher in C57BL/6 mice. It was verified by qPCR that infection induces *TgHSP70* expression in the brain mainly in C57BL/6 mice, and also increases the specific protein concentration in sera from both lineages, but only leads IC formation in BALB/c mice. Finally, these data suggest that circulating *TgHSP70* could be used as diagnostic tool for active infection in susceptible C57BL/6 mice and also that *TgHSP70*, in the other hand, could be used as adjuvant in immunization procedures.

Keywords: BALB/c and C57BL/6 mice, dexamethasone, IgY, immunization, *TgHSP70*, *Toxoplasma gondii*.

## LISTA DE ABREVIACÕES

<b>ACF</b>	Adjuvante completo de Freund
<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>AIF</b>	Adjuvante incompleto de Freund
<b>ANOVA</b>	Análise da variância
<b>Apaf-1</b>	Fator de ativação de apoptose 1
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATPase</b>	Enzima com sítio de clivagem de ATP
<b>Bcl-2</b>	Molécula <i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>CCR5</b>	C-C quimiocina receptora de tipo 5
<b>CD14</b>	<i>Cluster of differentiation 14</i>
<b>CD4</b>	<i>Cluster of differentiation 4</i>
<b>CD45</b>	<i>Cluster of differentiation 45</i>
<b>CD8</b>	<i>Cluster of differentiation 8</i>
<b>CD91</b>	<i>Cluster of differentiation 91</i>
<b>cDNA</b>	DNA circular
<b>CDs</b>	Células dendríticas
<b>Células NK</b>	Células <i>Natural Killer</i>
<b>C<sub>H</sub></b>	Região constante da cadeia pesada do anticorpo
<b>CI</b>	Complexos imunes
<b>C<sub>L</sub></b>	Região constante da cadeia leve do anticorpo
<b>conA</b>	Concanavalina A
<b>CXC</b>	Quimiocina da família CXC
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfatos
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DXM</b>	Fosfato de dexametazona
<b>ECL</b>	Eletroquimioluminescência
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
<b>ESA</b>	Antígeno excretado-secretado de <i>T. gondii</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FITC</b>	Isoticianato de fluoresceína
<b>GST</b>	Glutathione-S-transferase
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HSC70</b>	Chaperona de 70 kDa expressa constitutivamente
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>HSP70</b>	Proteína de choque térmico de 70 kDa
<b>IFN-β</b>	Interferon <i>beta</i>

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon <i>gamma</i>
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgY</b>	Imunoglobulina Y
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-17</b>	Interleucina 17
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>iNOS</b>	Sintase do óxido nítrico induzível
<b>IPTG</b>	<i>isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i>
<b>kDa</b>	kilodaltons
<b>LAC<sup>+</sup></b>	Fração positiva para lactose
<b>LB</b>	Lúria Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo bacteriano
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>MIC</b>	Proteína de micronema
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MW</b>	Peso molecular
<b>MWCO</b>	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
<b>MyD88</b>	Fator de diferenciação mielóide 88
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de Amônio
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OD</b>	Densidade óptica
<b>OPD</b>	Orto-fenilenodiamina
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PBS-T</b>	Salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20
<b>PBS-TM</b>	Salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 e leite desnatado
<b>PMNs</b>	Células polimorfonucleares
<b>PMSF</b>	Fenil-metano(sulfonil)fluoreto
<b>qPCR</b>	Reação da cadeia da polimerase quantitativa (em tempo real)
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SOCS-1</b>	Supressor de sinalização de citocinas 1
<b>STAg</b>	Antígeno solúvel de taquizoítas
<b>TBS</b>	Tampão tris salino
<b>TLR4</b>	Receptor semelhante a <i>toll 4 (toll like receptor 4)</i>
<b>TM-MIC</b>	Proteína de micronema transmembrânica
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TRIF</b>	Molécula adaptadora da via de sinalização de TLRs
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TRITC</b>	<i>Tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate</i>
<b>V<sub>H</sub></b>	Região variável da cadeia pesada do anticorpo
<b>V<sub>L</sub></b>	Região variável da cadeia leve do anticorpo

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Amostras de <i>TgHSP70</i> e IgY anti- <i>TgHSP70</i> possuem aproximadamente 90 % de pureza.....	35
<b>Figura 2.</b> Anticorpos IgY específicos possuem elevada afinidade e especificidade na detecção de <i>TgHSP70</i> .....	36
<b>Figura 3.</b> <i>TgHSP70</i> está presente no citoplasma de taquizoítas e colocaliza internamente com a membrana plasmática .....	38
<b>Figura 4.</b> Taquizoítas de <i>T. gondii</i> não secretam <i>TgHSP70</i> .....	39
<b>Figura 5.</b> A imunização de camundongos com r <i>TgHSP70</i> não protege contra infecção por <i>T. gondii</i> .....	41
<b>Figura 6.</b> <i>TgHSP70</i> estimula produção de anticorpos independente de ACF .....	43
<b>Figura 7.</b> Estimulação com <i>TgHSP70</i> induz proliferação de células do baço de camundongos BALB/c não imunizados .....	45
<b>Figura 8.</b> Reestimulo com <i>TgHSP70</i> induz produção de IFN- $\gamma$ e IL-10 pelas células do baço de camundongos BALBc imunizados com <i>TgHSP70</i> .....	47
<b>Figura 9.</b> Tratamento com DXM aumenta carga parasitária em camundongos C57BL/6 .....	50
<b>Figura 10.</b> Tratamento com DXM reduz a inflamação no cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 .....	51
<b>Figura 11.</b> Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados possuem maior expressão de <i>TgHSP70</i> no cérebro do que BALB/c .....	52
<b>Figura 12.</b> Tratamento com DXM não reduziu reatividade de anticorpos anti-STAg .....	54
<b>Figura 13.</b> Cinética da produção de anticorpos IgG por <i>C. callosus</i> imunizados com <i>TgHSP70</i> .....	56
<b>Figura 14.</b> <i>TgHSP70</i> induz formação de complexos imunes em camundongos BALB/c, mas não em C57BL/6.....	57

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose .....	14
1.2. Imunologia associada a toxoplasmose .....	16
1.3. Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSPs). ....	18
1.4. Imunoglobulina da gema de ovo (IgY) .....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Preparo de antígenos de <i>T. gondii</i> .....	22
3.2. Expressão e purificação de <i>TgHSP70</i> recombinante em <i>Escherichia coli</i> .....	23
3.3. Imunização de galinhas com <i>TgHSP70</i> para produção de IgY anti- <i>TgHSP70</i> .....	24
3.4. Purificação de anticorpos IgY da gema de ovo de galinha .....	24
3.5. ELISA para detecção de anticorpos IgY anti- <i>TgHSP70</i> .....	25
3.6. Imunização de <i>Calomys callosus</i> produção de IgG anti- <i>TgHSP70</i> .....	25
3.7. Purificação de anticorpos IgG de <i>C. Callosus</i> por cromatografia.....	26
3.8. Ensaio de <i>immunoblotting</i> .....	26
3.9. Imunolocalização de <i>TgHSP70</i> com IgY anti- <i>TgHSP70</i> em parasitas fixados .....	27
3.10. Camundongos experimentais e parasitas .....	22
3.11. Imunização experimental de camundongos com <i>TgHSP70</i> .....	27
3.12. Análise da proliferação celular por citometria de fluxo.....	28
3.13. ELISA sanduiche para detecção de citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 no sobrenadante da cultura de células do baço dos camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados.....	28
3.14. Infecção experimental e tratamento com fosfato de dexametazona (DXM).....	28
3.15. Reações de imunohistoquímica e análise do parasitismo tecidual de camundongos infectados .....	29
3.16. Avaliação de alterações histológicas no cérebro de camundongos infectados .....	30
3.17. Análise da expressão de <i>TgHSP70</i> por qPCR no cérebro de camundongos infectados .....	31
3.18. ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>TgHSP70</i> e anti-STAg no soro de <i>C. callosus</i> imunizados e de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados .....	31

3.19. ELISA sanduiche para detecção <i>TgHSP70</i> no soro dos animais experimentais infectados tratados ou não com DXM.....	32
3.20. ELISA para detecção complexos imunes (CI) com <i>TgHSP70</i> no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados .....	32
3.21. Análise Estatística .....	33
4. RESULTADOS .....	34
4.1. Galinhas imunizadas produzem anticorpos IgY de alta afinidade específicos anti- <i>TgHSP70</i> .....	34
4.2. <i>TgHSP70</i> está presente no citoplasma de taquizoítas .....	37
4.3. <i>TgHSP70</i> não é secretada por taquizoítas .....	39
4.4. Imunização de camundongos com <i>TgHSP70</i> não protege contra infecção por <i>T. gondii</i> .....	40
4.5. <i>TgHSP70</i> induz produção de anticorpos IgG anti- <i>TgHSP70</i> independente de ACF .....	42
4.6. <i>TgHSP70</i> estimula a proliferação de células do baço de camundongos não imunizados .....	44
4.7. <i>TgHSP70</i> não estimula produção de IFN- $\gamma$ e IL-10 em células do baço murinas .....	46
4.8. Tratamento com DXM aumenta carga parasitária e reduz inflamação no cérebro de camundongos C57BL/6.....	48
4.9. Infecção por <i>T. gondii</i> estimula expressão de <i>TgHSP70</i> no cérebro.....	52
4.10. Tratamento com DXM não reduz a reatividade dos anticorpos contra STAg .....	53
4.11. Infecção por <i>T. gondii</i> promove aumento da concentração de <i>TgHSP70</i> circulante e formação de complexo imune (CI) .....	55
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS .....	67
ANEXO I.....	80

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

*T. gondii* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório de células nucleadas de humanos e outros animais homeotermos, dentre eles aves e mamíferos (DUBEY, 2010). A toxoplasmose é uma doença de distribuição cosmopolita (JONES; DUBEY, 2010) e uma das zoonoses causadas por parasitas mais comuns no mundo. Estima-se que cerca de 1/3 da população adulta mundial esteja infectada pelo parasita. Mesmo países com melhores condições socioeconômicas possuem índices elevados de soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii*, como na França (61 %), Bélgica (57 %), Canadá (60 %), Estados Unidos (40 %). O Brasil apresenta porcentagens de indivíduos soropositivos para toxoplasmose entre 57 e 92 %, dependendo da localidade, faixa etária e das condições de saneamento locais (DUBEY, 2010; DUBEY *et al.*, 2012).

Devido à falta de uma vacina eficaz em humanos, a prevenção da transmissão se mostra o melhor meio de prevenção da toxoplasmose, devendo ser feita através da redução da exposição a oocistos, presentes na água e/ou no solo contaminado com fezes de felídeos infectados, e a cistos teciduais, encontrados em carne crua de animais frequentemente utilizados na alimentação humana (ELMORE *et al.*, 2010).

Embora a toxoplasmose seja assintomática em indivíduos saudáveis, podendo persistir ao longo de toda a vida sem ser diagnosticada, ela pode causar alterações graves em neonatos e pacientes imunocomprometidos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Desde a década de 60, o número de pacientes imunocomprometidos susceptíveis às diversas infecções vem aumentando a cada década e culminou no advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) no início dos anos 80. Além disso, com o aumento do número de transplantes e drogas imunossupressoras, atualmente muito utilizadas no tratamento de pacientes portadores de doenças autoimunes e neoplasias, os quais se tornam susceptíveis às infecções oportunistas, como *T. gondii* (FERREIRA; BORGES, 2002). Mesmo formas de baixa virulência de *T. gondii* possuem grande poder de causar danos em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) (HAQUE *et al.*, 1999), levando a quadros irreversíveis ou letais de encefalite toxoplásmica.

A transmissão vertical pode ocorrer em gestantes imunocompetentes previamente infectadas ou naquelas que se infectarem durante a gestação. Em pacientes gestantes infectadas com *T. gondii*, estima-se que 45% dos fetos tornam-se infectados e que cerca de

6% destes morrem, enquanto 10-30% desenvolvem sintomas como hidrocefalia, calcificação intracerebral, coriorretinite e retardo mental (ROBERTS; BREWER; ALEXANDER, 1994).

*T. gondii* apresenta três estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida: 1) os taquizoítas (do grego, *tachos* = rápido), formas que se reproduzem rapidamente e obrigatoriamente dentro de uma célula do hospedeiro formando estruturas conhecidas como vacúolos parasitóforos, sendo a forma predominante durante a fase aguda da doença; 2) os bradizoítas (do grego, *brady* = lento), formas que, devido ao estresse imposto pelo sistema imune, formam estruturas císticas no interior de células do hospedeiro, reproduzindo-se lentamente e sendo conhecida com a forma da fase crônica da infecção; e 3) os esporozoítas, formas infectantes resultantes da reprodução sexuada no intestino de felídeos (hospedeiros definitivos), sendo encontrada dentro de oocistos liberados nas fezes destes animais (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

O estudo filogenético e estatístico de vários isolados de *T. gondii* provindos de animais e humanos indicam que as cepas de *T. gondii* podem ser organizadas em 4 linhagens clonais. As cepas do tipo I são altamente virulentas e replicam-se rapidamente. Por outro lado, as cepas de baixa virulência do tipo II e III sofre diferenciação de taquizoítas proliferativos para bradizoítas contidos em cistos teciduais em estado de latência em resposta ao sistema imune do hospedeiro (HOWE; SIBLEY, 1995). Além dessas, a cepa do tipo 12 é uma cepa formada recentemente (cerca de 1000 anos atrás) pela recombinação genica entre parasitas das cepas de tipo 1 com outras cepas selvagens (KHAN *et al.*, 2011).

A sobrevivência de parasitas do filo Apicomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium* e *Cryptosporidium*) baseia-se no processo de invasão de células do hospedeiro. Parasitas livres na matriz extracelular se locomovem por meio de um processo que não envolve a emissão de pseudópodes conhecido como *gliding* (HÅKANSSON *et al.*, 1999). Ao encontro do parasita com uma célula alvo, o parasita inicia o processo de invasão celular constituída de várias etapas: 1) adesão inicial; 2) adesão apical; 3) formação da junção móvel; 4) Liberação de proteínas de ropria; 5) invasão; 6) fechamento do vacúolo e 7) separação da membrana plasmática (CARRUTHERS, BOOTHROYD, 2007). Os taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram tratados com IgG ou fragmentos Fab contra a proteína p30 e posteriormente utilizados para infecção, tiveram inibição parcial da porcentagem de adesão em fibroblastos humanos, indicando que a proteína p30 é necessária para invasão por *T. gondii* (MINEO, KASPER, 1994).

Durante a etapa de adesão apical, taquizoítas de *T. gondii* secretam proteínas de miconemas (MICs) através de uma via dependente de cálcio com a finalidade de



reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro (CARRUTHERS; GIDDINGS; SIBLEY, 1999). Proteínas MICs solúveis ou associadas à membrana plasmática (TM-MIC) são formadas no retículo endoplasmático e transportados pelo complexo de Golgi até a secreção (HUYNH *et al.*, 2003). As proteínas MIC1 formam complexos com proteínas MIC3 e são responsáveis por desenvolver o processo de invasão por *T. gondii*. Quando uma destas proteínas do parasita sofre depleção, o processo de invasão é comprometido, reduzindo a virulência da cepa *in vivo* (CÉRÈDE *et al.*, 2005). Além disso, como um mecanismo de regulação da secreção e exposição de proteínas de micronemas, TM-MIC possuem sítios de clivagem específicos para ação de proteases romboides, além de se ligarem a aldolases para permitir o funcionamento de outras proteínas MIC (SHEINER *et al.*, 2010). Porém, os mecanismos pelos quais as proteínas MICs interagem com as células do hospedeiro ainda não são totalmente conhecidos. Especula-se que o complexo formado pelas MIC1 e MIC6 seja capaz de interagir com dois domínios estruturais do fator de adesão endotelial presente nas células do hospedeiro (SAWMYNADEN *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se também que a fração MIC1 é uma lectina que reconhece  $\beta$ -galactosídeo presente na fração LAC<sup>+</sup> do extrato antigênico solúvel de *T. gondii*, indicando que as MIC também podem interagir com carboidratos presentes na membrana plasmática da célula do hospedeira (LOURENÇO *et al.*, 2001).

## 1.2. Imunologia associada a toxoplasmose

Durante infecção oral, as células epiteliais promovem a primeira barreira contra a infecção, as quais não são capazes de impedir que o parasita cruze o epitélio e se propague para outros tecidos, rompendo inclusive as barreiras biológicas da placenta, do cérebro e do olho (BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Camundongos descritos como suscetíveis à infecção por *T. gondii*, quando infectados oralmente, apresentaram alterações histológicas graves, como a perda de estrutura do epitélio, o encurtamento dos vilos, uma massiva migração de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos para lâmina própria, assim como focos de necrose (LIESENFELD *et al.*, 1996; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

A ativação da resposta imune inata contra *T. gondii* é desencadeada principalmente por receptores de reconhecimento padrão, como os receptores semelhantes à *toll* (TLRs) (PIFER, YAROWINSKI, 2011). A deficiência de TLR4 está envolvida com a redução da produção de interleucina 6 (IL-6), interferon *gamma* (IFN- $\gamma$ ) e IL-12, promovendo o aumento da carga

parasitária no cérebro (FURUTA *et al.*, 2006). Além dos neutrófilos e macrófagos, as células dendríticas também são capazes de produzir IL-12, a qual estimula a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos *natural killer* (NK) (RACHINEL *et al.*, 2004).

Em resposta à infecção por *T. gondii*, as células epiteliais produzem quimiocinas capazes de estimular células T CD4<sup>+</sup> e neutrófilos a produzirem IL-17, a qual induz quimiocinas CXC e, por consequência, recruta células polimorfonucleares (PMNs) para o sítio de infecção (KELLY *et al.*, 2005). A presença de PMNs no sítio de infecção induz a atração de outras células imunes, como as células dendríticas (CDs), as quais participam participar como um elo entre a resposta inata e adaptativa (LACHENMAIER *et al.*, 2011). No intestino, as CDs são encontradas principalmente nas regiões das placas de Peyer formando uma camada densa de células, onde obtêm acesso ao parasita por meio das células M. Durante a fase aguda da infecção, os parasitas podem eficientemente adentrar e sobreviver dentro de CDs e monócitos (CHANNON *et al.*, 2000).

As CDs (ALIBERTI *et al.*, 2003) e macrófagos (OLIVEIRA *et al.*, 2000) são importantes fontes de IL-12 decorrente da infecção por *T. gondii*. Porém, *T. gondii* possui mecanismos capazes de evadir da resposta imune e reduzir a sinalização via IFN- $\gamma$  através da molécula supressora de sinalização de citocinas (SOCS-1) (STUTZ *et al.*, 2011). Quando ativados, macrófagos produzem TNF, que juntamente com TNF- $\alpha$  produzido por células T CD4<sup>+</sup> da lâmina própria, amplificam a produção da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) (LIESENFELD *et al.*, 1999). Porém, uma produção exagerada de óxido nítrico (NO), IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  contribuem para a inflamação e até necrose no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados e, se não controlada, essa resposta pode levar à morte (KHAN *et al.*, 1997; LIESENFELD *et al.*, 1999).

A resposta imune adquirida contra *T. gondii* é formada através da apresentação de antígenos pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II de CDs e macrófagos e MHC classe I. As duas principais populações de células T ativadas por este mecanismo são os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Porém, tem sido sugerido que o principal papel das células T CD4<sup>+</sup> na infecção é como células auxiliares das células T CD8<sup>+</sup> (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Além da produção de citocinas, estes dois tipos celulares, quando ativados pelo MHC, são capazes de romper células infectadas ou incubadas com antígenos solúveis de *T. gondii* (KHAN; SMITH; KASPER, 1998; SUBAUSTE; KONIARIS; REMINGTON, 1991), podendo inclusive liberar parasitas intracelulares para o meio extracelular, onde se tornam alvos da eliminação eficiente mediada por anticorpos e pelo complemento (KHAN; SMITH; KASPER, 1998). Em modelos murinos, os infiltrados

celulares relacionados com a encefalite toxoplásmica no cérebro de camundongos adultos são compostos de macrófagos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, enquanto que a resposta inflamatória em neonatos é predominantemente de macrófagos, granulócitos e astrócitos (DECKERT-SCHLÜTER *et al.*, 1994). Porém, a falta de mecanismos reguladores eficazes da resposta contra o parasita pode levar a quadros imunopatológicos graves (GAZZINELLI *et al.*, 1996).

### 1.3. Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSPs).

As HSPs pertencem a um grupo de chaperonas altamente conservadas e são expressas tanto de forma constitutiva quanto induzida em células de quase todos os seres vivos. As HSPs são classificadas em famílias: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e as pequenas HSPs (sHSPs), de acordo com sua massa molecular aproximada em gel de poliacrilamida (LIU; DANIELS; CAO, 2012). Sob condições de estresse, como temperatura elevada, estresse químico/oxidativo, infecção ou inflamação, a expressão de HSPs tem sido associada com a proteção contra efeitos deletérios destas condições (LIU *et al.*, 1992). A HSP70 (também chamada de HSP72, HSP70-1 ou HSPA1A) é uma chaperona de aproximadamente 70 kDa dependente de ATP que está presente em baixas concentrações ou níveis indetectáveis na maioria das células e tecidos sob condições naturais (MAYER; BUKAU, 2005). A HSP70 comumente apresenta duas porções: (1) uma região mais evolutivamente conservada, N-terminal, que possui um domínio de clivagem de moléculas de adenosina trifosfato (ATPase) e (2) outra região mais variável, C-terminal, a qual possui o sítio catalítico de atividade enzimática (KAMPINGA; CRAIG, 2010). As proteínas HSP90 e HSP70 são responsáveis pela regulação do processamento de outras proteínas no citoplasma e posterior apresentação cruzada por MHC de classe I (KATO *et al.*, 2012). Sob condições de anormalidade, a HSP70 encontrada no meio extracelular é capaz de ligar em receptores TLR2, TLR4 e da molécula adaptadora CD14 e gerar ativação celular (ASEA *et al.*, 2002).

A HSP70 de *T. gondii* (TgHSP70) é expressa durante a diferenciação de taquizoítas para bradizoítas (WEISS *et al.*, 1998) e de bradizoítas para taquizoítas (SILVA *et al.*, 1998). Em camundongos infectados com a cepa Fukaya (tipo II) e tratados com HSP70 recombinante de *T. gondii*, foi possível detectar a expressão de TgHSP70 em macrófagos peritoneais e redução de óxido nítrico tanto em camundongos BALB/c e C57BL/6 (controles) quanto naqueles deficientes em IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>) e sugerindo que ela seja um sinal de perigo durante a infecção aguda por *T. gondii* (MUN *et al.*, 2000). Além disso, a TgHSP70 é uma molécula

que possui elevado potencial imunogênico (MUN *et al.*, 1999; MA *et al.*, 2009) e por isso é considerada uma boa opção de antígeno para imunização e/ou vacinação contra *T. gondii*.

Ademais, o tratamento de camundongos durante a fase aguda da doença com TgHSP70 leva camundongos a choque anafilático devido ativação de fosfolipase A<sub>2</sub> circulante e produção de fator de ativação de plaquetas via TLR4 dependente de MyD88 (FANG *et al.*, 2008). Além disso, o parasita é capaz de modular também o processo de apoptose pela via mitocondrial através do aumento de produtos anti-apoptóticos como Bcl-2 e HSP70 do hospedeiro, a qual se liga ao complexo apoptótico Apaf-1 e inibe a ativação de caspase 3 (HWANG *et al.*, 2010).

#### **1.4. Imunoglobulina da gema de ovo (IgY)**

A IgY é transferida para a gema do ovo através de um receptor Fc (FcRY) acoplado na membrana da gema. O FcRY compartilha semelhanças estruturais com os receptores de manose encontrados nos mamíferos e é capaz de organizar em dímeros para permitir a ligação da IgY e desencadear a internalização do anticorpo. Além disso, a afinidade entre o receptor e a IgY é dependente do pH, de modo que a alteração do pH 6,0 para pH 8,0 promove alongamento do receptor e impedindo a ligação do anticorpo (HE, BJORKMAN, 2011).

A estrutura da IgY (de aproximadamente 180 kDa) é muito semelhante a da IgG encontrada nos mamíferos, sendo constituída de duas cadeias leves (22 kDa cada) contendo um sítio constante (C<sub>L</sub>) e um sítio variável (V<sub>L</sub>) e duas cadeias pesadas contendo quatro domínios constantes (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> e C<sub>H4</sub>) e um variável (V<sub>H</sub>) (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A utilização de IgY como ferramenta laboratorial ou para fins terapêuticos possui grande vantagem em relação à IgG de mamíferos em vários aspectos. Devido à distância filogenética entre aves e mamíferos, os anticorpos IgY não são reconhecidos por fatores reumatóides nem receptores Fc de mamíferos e não ativam o sistema complemento (LARSSON; KARLSSON-PARRA; SJOQUIST, 1991; LARSSON *et al.*, 1992; LARSSON *et al.*, 1993). Além disso, o processo de extração de IgG requer sangria de animais para coleta do soro enquanto que a purificação de IgY é feita através da gema de ovos coletados das galinhas sendo um método não invasivo (STÅLBERG, LARSSON, 2001). Não obstante, outro forte motivo para a purificação de IgY deve-se ao fato de que o isolamento de anticorpos de ovos postos por uma galinha durante um mês equivale a quase 8 vezes mais a

quantidade de anticorpos produzidos por um mamífero em 40 mL de sangue. Além disso, um ovo contém entre 2 a 10% de anticorpos IgY específica (SCHADE *et al.*, 1996).

Galinhas poedeiras imunizadas com antígeno de interesse são capazes de botarem ovos com altos títulos de anticorpos por até 2 anos. Além disso, as galinhas utilizadas para este fim aumentam a média da quantidade de IgY na gema progressivamente com o tempo de imunização. Entretanto, após o primeiro ano em experimentação ocorre decréscimo entre 30 a 70 % do número de ovos coletados. (PAULY *et al.*, 2009).

A utilização de IgY abrange um campo muito vasto de possibilidades de imunização passiva contra várias infecções bacterianas como *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e outras, bem como também na proteção contra rejeição de transplantes xenográficos, redução da inflamação crônica intestinal (utilizando IgY anti-TNF), inibição da migração de células de glioma e do crescimento de células cancerígenas (revisado em SPILLNER *et al.*, 2012).

Deste modo, propusemos avaliar o papel da TgHSP70 como uma ferramenta no diagnóstico da toxoplasmose através da detecção de anticorpos anti-TgHSP70, TgHSP70 e complexo imune circulante no soro utilizando IgY e IgG de *Calomys* específicas anti-TgHSP70. Além disso, iniciamos análises da resposta imune frente à imunização de camundongos com a TgHSP70.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da *TgHSP70* como ferramenta diagnóstica da toxoplasmose ativa e crônica através da detecção de anticorpos específicos, *TgHSP70* e complexos imunes circulantes e também o papel da proteína como antígeno vacinal.

### 2.2. Objetivos específicos

- Produzir *TgHSP70* de alta pureza para utilização nos experimentos subsequentes;
- Produzir IgY anti-*TgHSP70* e avaliar sua pureza, avidéz e especificidade;
- Produzir IgG de *Calomys* anti-*TgHSP70*;
- Utilizar a IgY como ferramenta para detecção de *TgHSP70* presente em taquizoítas, bem como no antígeno excretado-secretado de *T. gondii*;
- Avaliar se o papel da *TgHSP70* na modulação da resposta imune e seu efeitos durante a imunização de camundongos;
- Avaliar o efeito do tratamento de camundongos BALB/c e C57BL/6 cronicamente infectados e tratados com fosfato de dexametazona (DXM) no parasitismo, alterações histológicas e na expressão de *TgHSP70* no cérebro de camundongos infectados;
- Avaliar o efeito do tratamento de camundongos BALB/c e C57BL/6 cronicamente infectados e tratados com DXM na concentração de anticorpos anti-STAG e anti-*TgHSP70*, bem como na concentração de HSP70 circulante e na formação de complexos imunes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Camundongos experimentais e parasitas

Camundongos fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6, 8 semanas de idade, foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob condições de disposição de água e ração *ad libitum* sob parecer de ética número 060/09 (Anexo 1).

A cepa ME-49 de *T. gondii* foi mantida como previamente descrito (BARBOSA *et al.*, 2007). Cistos foram obtidos de cérebros de *C. calosus* infectados oralmente 1 mês antes com 20 cistos.

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos em células de linhagem de adenocarcinoma humano (HeLa) in vitro como descrito (BARBOSA *et al.*, 2012). As células foram cultivadas em garrafas contendo meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) adicionado de antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 10 % de soro fetal bovino (SFB, Cultilab). Em paralelo, taquizoítas da cepa RH e foram mantidos em células HeLa em meio RPMI 1640 suplementado de antibióticos e 2 % de SFB com passagens regulares a cada 48 horas.

#### 3.2. Preparo de antígenos de *T. gondii*

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos em camundongos BALB/c por meio de passagens regulares a cada 48 horas (SILVA *et al.*, 2007). Taquizoítas foram obtidos do peritônio de camundongos BALB/c infectados e depois centrifugados (70 × g, 1 min). O sobrenadante livre de células do camundongo foi centrifugado (800 × g, 10 min) para obtenção dos parasitas, os quais foram submetidos à produção do antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) ou fixados em formalina por 1 minuto e depois adicionados em lâminas de imunofluorescência para análise da localização de TgHSP70 no parasita.

O STAg foi preparado como descrito anteriormente (GAZZINELLI *et al.*, 1991). Inibidores de protease foram adicionados ao sedimento de parasitas e submetidos a 3 ciclos de criólise seguido de sonicação (8 ciclos de 30 segundos). Em seguida, o homogenato foi centrifugado (10.000 × g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi coletado para quantificação proteica pelo método de Bradford. Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20 °C até momento do uso.

O antígeno excretado-secretado (ESA) foi feito como descrito (RIBEIRO *et al.*, 2009). Parasitas coletados do peritônio de camundongos BALB/c como descrito acima foram incubados em solução salina de Hank (HBSS) por 30 minutos a 37°C. Depois de sedimentar os parasitas (800 × g, 10 min), o sobrenadante (ESA) foi coletado e concentrado em tubos Vivaspín® 10 MWCO (GE Healthcare). A concentração proteica foi mensurada pelo método de Bradford e as amostras foram congeladas a -20 °C até momento do uso.

### 3.3. Expressão e purificação de TgHSP70 recombinante em *Escherichia coli*

O plasmídeo pGEx-4T-2 contendo a sequência da proteína recombinante TgHSP70 (número de acesso: AF045559.1) em fusão com glutathione-S-transferase (GST, 26 kDa) com sítio de clivagem para trombina foi cedido gentilmente pelo Dr. Louis M. Weiss (Albert Einstein College of Medicine, New York, EUA). O plasmídeo foi inserido em *Escherichia coli* BL21 DE3 Rosetta.

Culturas primárias de 3 mL de meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL foram crescidas durante a noite a 175 rpm a 37 °C. Um mililitro da cultura foi adicionada em 1 L de meio LB adicionado de ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. A cultura foi então incubada a 37 °C sob agitação até alcançar a DO<sub>600</sub> de 0,5. As culturas crescidas foram induzidas com IPTG 1 mM (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*; Sigma Chemicals Co., St. Louis, CA) e incubadas a 175 rpm, 20 °C por 20 horas.

Culturas de bactérias foram sedimentadas por centrifugação (4000 × g, 20 min, 4 °C). O sedimento foi ressuspensionado em 3 % do volume de cultura inicial de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM e lisozima 1 mg/mL, Sigma) e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram submetidas a 6 ciclos de criólise e sonicação no gelo (8 ciclos de 30 segundos com intervalos de 5 segundos). Depois, o homogenato foi centrifugado a 10,000 × g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e adicionado à coluna de afinidade por GST segundo as instruções do fabricante (GE Healthcare, Fairfield, EUA). Logo após o extrato foi adicionado à resina de glutathione-sepharose 4 FF (2 mL, GE Healthcare) pré-equilibrada com PBS. A coluna foi lavada com PBS para remoção de moléculas não aderidas e a concentração proteica foi avaliada pelo método de Bradford. Assim que não fosse mais detectado nível proteico no lavado, 160 unidades de trombina foram adicionadas e a coluna foi incubada sob agitação por 16 horas a temperatura ambiente. Após a incubação, a fração contendo a proteína recombinante de interesse (TgHSP70) foi



submetida à cromatografia de afinidade em resina de polimixina B para remoção de LPS. Para a concentração, a amostra foi centrifugada em tubos Vivaspín® 50 MWCO (GE Healthcare). A concentração proteica da amostra final foi mesurada pelo método de Bradford e então as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 10 %, o gel foi corado com Coomassie G-250. As imagens dos géis foram analisadas usando o programa Image J® (NIH, EUA).

### **3.4. Imunização de galinhas com TgHSP70 para produção de IgY anti-TgHSP70**

Galinhas poedeiras da linhagem Leghorn com 25 semanas de idade foram obtidas da Sadia (São Paulo, Brasil) e mantidas em gaiolas individuais com disposição de água e ração comercial *ad libitum*. Os experimentos utilizando as galinhas foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) sob número de protocolo 107/11.

A imunização das galinhas foi procedida como descrito anteriormente (FERREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Amostra de TgHSP70 purificada e livre de LPS foi emulsificada (v/v) em adjuvante completo de Freund (ACF; Sigma) utilizando a concentração final de 200 µg/mL. A solução (0,5 mL, 100µg por galinha, n=4) foi injetada por via intramuscular no músculo peitoral. Outras duas doses contendo a mesma quantidade de TgHSP70 porém com adjuvante incompleto de Freund (AIF; Sigma) foram realizadas 15 e 30 dias após a primeira imunização.

### **3.5. Purificação de anticorpos IgY da gema de ovo de galinha**

Os ovos foram coletados diariamente, a clara foi descartada e a gema foi armazenadas a -20 °C até o momento do uso. A delipidização da gema de ovo e purificação da IgY foram realizadas conforme descrito (FERREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Um grama de gema de ovo foi homogeneizada em 9 mL de água deionizada e o pH da solução foi ajustado para 5,0 com HCl 0,1 N. Após congelamento a -20 °C por 24 horas e descongelamento a 4 °C, a amostra foi centrifugada a 10.000 × g por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e submetido à precipitação com sulfato de sódio 19% por 2 horas sob agitação. Depois de centrifugar a amostra (10.000 × g por 25 minutos a 4 °C), o sedimento foi coletado e submetido à diálise contra PBS por 48 horas. A concentração proteica foi mensurada pelo método de Bradford e

as amostras foram congeladas a -20 °C até momento do uso. As amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 8 % e analisadas como descrito acima.

### 3.6. ELISA para detecção de anticorpos IgY anti-*TgHSP70*

A determinação da produção de anticorpos IgY anti-*TgHSP70* foi feita por ELISA em placas de baixa afinidade (Kartell spa, Noviglio, Italy) sensibilizadas com *TgHSP70* (2,5 µg/mL), STAg (5 µg/mL) ou ESA (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato pH9,6 e incubado a 4 °C durante a noite. As placas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e incubadas com 2 µg/poço de IgY purificada diluída em PBS-T adicionado de leite desnatado 1 % (Molico, Nestlé, Brasil) por 1 hora a 37 °C. Depois de lavadas por 6 vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com anticorpo secundário de coelho anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:30.000 em PBS-T por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelada com *o-phenylenediamine* (OPD; Sigma) e parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A absorbância foi mensurada a 495 nm em leitora de microplacas TP Reader (Thermoplate, São Paulo, Brasil).

Para avaliação da maturação de avidez da IgY, foi realizado um ensaio ELISA semelhante ao descrito acima. Porém, após incubação das amostras e lavagem com PBS-T, as placas foram submetidas a uma lavagem adicional com PBS-T contendo uréia 6 M por 10 min a temperatura ambiente e posteriormente lavadas novamente por 3 vezes com PBS-T antes da incubação com o anticorpo secundário. O cálculo da quantidade de anticorpos com alta avidez foi feito dividindo-se a média da absorbância (OD) das reações que foram incubadas com uréia sobre a média da absorbâncias das reações incubadas com PBS e multiplicando o valor final por 100 para expressão dos resultados em porcentagem:

$$[\% \text{ IgY}_{\text{ALTA AFINIDADE}}] = \frac{[\text{média OD}_{\text{URÉIA}}]}{[\text{média OD}_{\text{PBS}}]} \times 100$$

### 3.7. Imunização de *Calomys callosus* produção de IgG anti-*TgHSP70*

*Calomys callosus* foram imunizados por via subcutânea com 10 µg/mL de *TgHSP70* recombinante emulsificada v/v em ACF em um volume final de 200 µL. Outras duas doses contendo 10 µg/mL de *TgHSP70* misturado v/v em AIF foram inoculadas por via subcutânea nos animais 15 e 30 dias depois. O sangue foi coletado antes da imunização (dia 0) e a cada 15 dias de imunização (dias 15, 30, 45 e 60 de imunização). As amostras de soro foram

testadas por ELISA para determinação do nível de anticorpos IgG anti-*TgHSP70* presente em cada amostra.

### **3.8. Purificação de anticorpos IgG de *C. Callosus* por cromatografia**

Amostras de soro de *C. callosus* imunizados com *TgHSP70* com maiores níveis de anticorpos anti-*TgHSP70* foram submetidas à purificação de IgG por cromatografia de afinidade em resina de proteína G segundo o protocolo do fabricante (Sigma). Rapidamente, as amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0 e aplicadas à coluna pré-equilibrada com o mesmo tampão. Após lavagem da coluna para remoção de moléculas não adsorvidas, a coluna foi eluída com tampão glicina pH 2,0. O pH das amostras foi corrigido para 7,0 com tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,5. A amostra foi então centrifugada em tubos Vivaspin® 50 MWCO (GE Healthcare). A concentração proteica da amostra final foi mensurada pelo método de Bradford e então as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

### **3.9. Ensaio de immunoblotting**

*TgHSP70*, antígenos solúveis de parasitas (STAg, ESA) foram separados em SDS-PAGE 8 %. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e bloqueadas com tampão tris salino 20 mM (TBS) contendo Tween 20 0,1 % (TBS-T) e leite desnatado 5 % (TBS-TM 5 %) por 2 horas a temperatura ambiente. Após 6 lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com IgY anti-*TgHSP70* (8 µg/mL) diluído em TBS-TM 1 % durante a noite a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas por 6 vezes com TBS-T e incubadas com anticorpo anti-IgY conjugado com peroxidase (1:20.000; Sigma) diluído em TBS-TM 1 % por 2 horas a temperatura ambiente. A reação para detecção de p97 foi realizada de forma semelhante utilizando anticorpo monoclonal de anti-p97 (hibridoma 1B8) diluído 1:1000 seguida do secundário de cabra anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase diluído 1:1000. As membranas foram reveladas com kit ECL (GE Healthcare) depois documentadas em escâner HP Scanjet G4050 (Palo Alto, CA, EUA).

### 3.10. Imunolocalização de *TgHSP70* com IgY anti-*TgHSP70* em parasitas fixados

Lâminas contendo parasitas fixados foram permeabilizadas (Triton X-100 0,1%, citrato de sódio 0,1%) por 5 minutos, lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpos primários [IgY anti-*TgHSP70* 150 µg/mL; soro de camundongo anti-MIC1/4 1:25; sobrenadante do hibridoma A3A4 anti p-30 (CARVALHO *et al.*, 2008) 1:2; soro de camundongo anti-STAg 1:100] diluídos em PBS por 1 hora a 37 °C. Depois de 6 lavagens em PBS, as lâminas foram incubadas por 1 hora a 37 °C com anticorpos secundários (anti-IgY conjugado com FITC diluído 1:600 e anti-IgG de camundongo conjugado com TRITC diluído 1:200; Sigma) diluídos em PBS. Como controle, todas as reações foram também feitas sem permeabilização ou utilizando anticorpos primários de galinhas e camundongos não imunizados (controle isotípico). As lâminas foram então montadas com lamínula e examinadas em microscópio confocal LSM META 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### 3.11. Imunização experimental de camundongos com *TgHSP70*

A imunização de camundongos com *TgHSP70* foi feita em duas etapas. A primeira consistia na imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com 10 µg/animal de *TgHSP70* seguida de 2 doses adicionais com a mesma concentração após 15 e 30 dias. Como controle, um grupo de cada linhagem foi tratado com o diluente (PBS). Sessenta dias após a primeira imunização, metade dos grupos de cada linhagem de camundongos foi infectada com 10 cistos da cepa ME-49 e a outra metade com 100 taquizoítas a cepa RH de *T. gondii*. Durante o curso da infecção, foram observadas alterações na massa corpórea e no escore de morbidade (BARTLEY *et al.*, 2006).

Em outra etapa, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 10 µg/animal de *TgHSP70* recombinante emulsificada v/v em ACF em um volume final de 200 µL. Outras duas doses contendo 10 µg/animal de *TgHSP70* emulsificado v/v em AIF foram inoculadas por via subcutânea nos animais 15 e 30 dias depois. Quarenta e cinco dias após a primeira imunização, os animais foram anestesiados (Ketamine 10% e Xilazine 2% na proporção 2:1; Syntec, Cotia, Brasil) e o sangue dos animais foi coletado através de punção do plexo retro-orbital para obtenção do soro. Depois da retração do coágulo, o soro foi separado, centrifugado a 2000 × g durante 15 minutos e conservado a -20°C, até o momento do uso. Além disso, o baço foi coletado para análise da proliferação celular por citometria de fluxo e da produção de IFN-γ e IL-10 por ELISA.

### 3.12. Análise da proliferação celular por citometria de fluxo

Baços dos animais imunizados foram coletados, macerados individualmente e incubados em tampão de lise (144 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 17 mM Tris-HCl, pH 7,4) para lise de hemácias. As células foram lavadas por 3 vezes com meio RPMI 1640 e então centrifugadas a  $300 \times g$  por 5 minutos.

Para o ensaio de proliferação, as células foram ressuspensas no mesmo meio suplementado com antibióticos (100 U/mL de penicilina e estreptomicina; Sigma) 200  $\mu\text{M}$  de glutamina (Sigma) e 50  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma). As células ( $1 \times 10^7$  células por mL) foram então plaqueadas em placas de cultivo celular de fundo chato (Jet-Biofil, Toronto, Canadá) juntamente com 5  $\mu\text{M}$  de CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Sigma). As células foram incubadas a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 72 horas. Após este tempo as foram submetidas à leitura em FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, EUA)

Para os ensaios de reestimulação, as células foram ressuspensas no em meio suplementado com penicilina e estreptomicina (Sigma), glutamina (Sigma),  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, Brasil). As células foram então plaqueadas em placas de cultivo celular de fundo chato de 24 poços (Jet-Biofil, Toronto, Canadá) juntamente com 10  $\mu\text{g/mL}$  de STAg, TgHSP70, concanavalina A (conA, Sigma) ou meio. As células foram incubadas a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 72 horas.

### 3.13. ELISA sanduiche para detecção de citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 no sobrenadante da cultura de células do baço dos camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados

A dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura das células do baço foi feita por meio de ELISA sanduiche como descrito anteriormente (SILVA *et al.*, 2012) utilizando *kit* específicos para detecção de IFN- $\gamma$  (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, EUA) e IL-10 (OpTEIA, BD Bioscience, San Diego, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração de citocinas foi calculada por meio de uma curva padrão de citocina recombinante fornecida juntamente com os *kits*.

### 3.14. Infecção experimental e tratamento com fosfato de dexametazona (DXM)

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados por via intraperitoneal com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e sacrificados aos 30 e 56 dias após a infecção. Outro

grupo foi tratado com 10 mg/L de DXM (um imunossupressor) na água de beber (KANG *et al.*, 2006) a partir do 32º dia de infecção até o dia do sacrifício aos 56 dias após a infecção. Durante o período de tratamento, os grupos que foram observados diariamente quanto ao escore de morbidade (BARTLEY *et al.*, 2006).

Antes do sacrifício, os animais foram anestesiados, o sangue coletado para separação do soro. Após o sacrifício o cérebro foi coletado e os 2 hemisférios foram divididos com 2 objetivos: 1) fixação em formol tamponado a 10% para ser posteriormente incluído em parafina e ser processado em micrótomo (Reichert, Leica, Wetzlar, Germany), para posterior análise da patologia por Hematoxilina e Eosina (H&E) e do parasitismo por imunohistoquímica e 2) congelamento instantâneo em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA mensageiro (mRNA) para a qPCR.

### **3.15. Reações de imunohistoquímica e análise do parasitismo tecidual de camundongos infectados**

Para detecção de parasitas, foi utilizado antissoro policlonal de *C. callosus* cronicamente infectado com o parasita. Os cortes teciduais foram desparafinados e reidratados em concentrações decrescentes de álcoois. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito incubando-se as lâminas durante 30 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% v/v a 3%. A seguir as lâminas foram imersas em PBS durante 5 minutos e o resgate de sítios antigênicos foi feito em tampão citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas em potência máxima, por 7 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com leite em pó Molico 3% m/v durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após este tempo, as lâminas foram incubadas com antissoro primário produzido em *C. callosus* diluído a 1:100 em PBS saponina 0,01% m/v, durante toda a noite a 4°C. Após este período de incubação as lâminas foram imersas em PBS. O anticorpo secundário utilizado foi  $\gamma$ -globulina de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com biotina (Sigma), na diluição de 1:300 em PBS. As lâminas foram incubadas com o antissoro secundário, durante 1 hora a 37°C; logo após, imersas em PBS. A reação foi amplificada com o complexo ABC (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Califórnia) na diluição 1:100, durante 45 minutos a 37°C. Após este período as lâminas foram imersas em PBS. A reação foi revelada com uma solução cromógena, filtrada, que consiste de 10 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Sigma) diluída em 20 mL de PBS e 16  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio 30% v/v adicionada no momento do uso. A contracoloração foi feita em hematoxilina de

Harris, durante 3 segundos à temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram imersas em água corrente durante 10 minutos. Finalizada a reação, as lâminas foram desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), xilol e montagem em lamínula.

A avaliação do parasitismo no cérebro de cada animal foi feita pela razão entre o número de parasita e a área tecidual analisada de cada camundongo. O número de parasitas é definido pela soma da contagem total das formas parasitárias semelhantes a cistos e de vacúolos parasitóforos. Para análise da área tecidual, fotomicrografias foram obtidas com aumento de 20 x com o programa HLImage (Western vision software, Salt Lake City, USA) de partes de cada secção tecidual, as quais foram posteriormente montadas (Microsoft Image Composite Editor, Microsoft, Redmond, USA) para criação da imagem panorâmica da secção tecidual para posterior mensuração da área (ImageJ, National Institutes of Health, USA).

### **3.16. Avaliação de alterações histológicas no cérebro de camundongos infectados**

As lâminas foram desparafinadas em xilóis e hidratadas em álcoois de concentrações decrescentes. As lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e imersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto. A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, em água destilada por mais 5 minutos e depois imersas em corante Eosina-Fucsina por 2 minutos. Finalizada a coloração, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas e montadas sob lamínula.

A avaliação do escore inflamatório foi realizado com descrito anteriormente (SILVA *et al.*, 2010). Para obter o escore do infiltrado inflamatório o número total de focos inflamatórios focais (nódulos gliais) ou difusos foi quantificado em seções sagitais e na bainha dos vasos sanguíneos (manguito perivascular), bem como a infiltração de células inflamatórias nas meninges, que também foi analisada. Os escores inflamatórios nos órgão periféricos e cérebro foram representados como unidades arbitrárias como sendo: 0 – 2, suave; 2,1 – 4, moderado; 4,1 – 6, grave; e acima de 6, muito grave. Todas as análises foram feitas em dois cortes histológicos por animal, em pelo menos quatro animais por grupo, com a objetiva de 40 x de aumento, em ensaio duplo cego.

### 3.17. Análise da expressão de *TgHSP70* por qPCR no cérebro de camundongos infectados

Cérebros de camundongos BALB/c e C57BL/6 experimentais infectados com *T. gondii* foram submetidos a extração de RNA pelo método do Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram então congeladas a -80 °C até o momento do uso.

Para uma reação de confecção do cDNA, o RNA (5 ng/μL) foi misturado com oligo (dT) primer (Promega, Fitchburg, EUA). A mistura foi aquecida a 70 °C durante 5 minutos em termociclador TC-3000 (Techne, Staffordshire, Reino Unido) e depois adicionada de 11,5 uma solução (contendo um tampão, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, a enzima transcriptase reversa; Promega) e água de acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Em seguida, a mistura final foi incubada a 42 °C por 1 hora no mesmo termociclador. Por fim, foi adicionado 17,5 μL de água e as amostras foram congeladas a -20 °C até o momento do uso.

Para a reação de qPCR, as amostras (2 μL) foram misturadas com SYBR (Life Technologies) e primers (0,15 pMol/μL) até o volume final de 10 μL por reação. Os primers utilizados foram para detecção de GAPDH (F: 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG-3'; R: 5'-CAGTGTAGCCCAAGATGCCC-3') e *TgHSP70* (F: 5'-TCGGCAAGGAAGTGAAGGAG-3'; R: 5'-TTGATAATGCGGAGGACGCT-3'). A reação foi realizada utilizando 40 ciclos com temperatura de anelamento a 62 °C por 2 minutos desenvolvida em aparelho de qPCR ABI7500 (Life Technologies). A análise dos resultados foi feita pelo método do delta-delta Ct (LIVAK, SCHMITTEN, 2001).

### 3.18. ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*TgHSP70* e anti-STAg no soro de *C. callosus* imunizados e de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados

A detecção de anticorpos IgG total anti-*TgHSP70* e anti-STAg do soro dos animais (*C. callosus* e camundongos BALB/c e C57BL/6) foi feita utilizando placas de baixa afinidade (Kartell) sensibilizadas com *TgHSP70* (2,5 μg/mL) ou STAg (5 μg/mL) diluído em tampão carbonato pH9,6 e incubado a 4 °C durante a noite. Após lavagens, foi adicionado o soro dos animais diluído 1:25 (*TgHSP70*) e 1:64 (STAg) em PBS-T adicionado de leite desnatado 1% (Nestlé). Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:1000. A reação foi revelada



com OPD (Sigma) e parada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N. A absorbância foi mensurada a 495 nm em leitora de microplacas TP Reader (Thermoplate).

As reações para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-STAG e anti-*TgHSP70* foram realizadas de maneira semelhante. Placas de alta afinidade (Costar-Corning, Tewksbury, USA) foram sensibilizadas com *TgHSP70* (2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) ou STAg (5  $\mu\text{g/mL}$ ) a 4°C durante a noite. Em seguida as placas foram incubadas com o soro dos animais diluído 1:10 seguido da incubação com anticorpo secundário anti-IgG1 (1:6000) e anti-IgG2a (1:2000). A reação foi revelada com OPD (Sigma) e parada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N. A absorbância foi mensurada a 495 nm em leitora de microplacas TP Reader (Thermoplate).

### **3.19. ELISA sanduiche para detecção *TgHSP70* no soro dos animais experimentais infectados tratados ou não com DXM**

A quantificação de HSP70 circulante foi verificada por ELISA sanduiche utilizando placas de alta afinidade (Costar-Corning, Tewksbury, USA) sensibilizadas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de IgG de *C. calosus* purificada anti-*TgHSP70* diluído em tampão carbonato pH 9,6 e incubado a 4 °C durante a noite. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e incubadas com soro dos animais experimentais infectados (diluídos 1:40) por 1 hora a 37 °C. Depois de lavadas por 6 vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com 25  $\mu\text{g/mL}$  de IgY anti-*TgHSP70* em PBS-TM 1 % por 1 hora a 37 °C. Uma curva padrão de 11 pontos (fator de diluição igual a 2) de concentração inicial de 5  $\mu\text{g/mL}$  de *TgHSP70* foi adicionada a cada placa. Em seguida as placas foram lavadas por 6 vezes e incubadas com anticorpo de coelho anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:30.000 em PBS-T por 1 hora a 37 °C. Os passos de revelação e mensuração foram feitas como descrito nos ensaios ELISA para detecção de anticorpos. Os valores obtidos de cada animal foram normalizados utilizando a curva padrão para obtenção dos valores da concentração de *TgHSP70*.

### **3.20. ELISA para detecção complexos imunes (CI) com *TgHSP70* no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados**

A detecção de CI foi realizada como descrito por (CHAVES-BORGES *et al.*, 1999), utilizando placas de baixa afinidade (Kartell) sensibilizadas com anticorpo IgY anti-*TgHSP70* (10  $\mu\text{g/mL}$ ) diluído em tampão carbonato pH9,6 e incubado a 4 °C durante a noite. Após lavagens, foi adicionado o soro dos animais diluído 1:40 em PBS-TM 1% (Nestlé). Após

lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:1000. A reação foi revelada com OPD (Sigma) e parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A absorbância foi mensurada a 495 nm em leitora de microplacas TP Reader (Thermoplate). Para determinação do *Cutoff*, foi feita a média das ODs do grupo de animais não infectados (*sham*) adicionado de 3 desvios padrões (SD) do mesmo grupo.

$$Cutoff = [média OD_{SHAM}] + 3 \times [SD \text{ das } OD_{SHAM}]$$

O calculo do índice ELISA (IE) foi realizado dividindo-se as ODs de cada grupo de animais infectados experimentalmente pelo *Cutoff*:

$$\text{Índice ELISA} = \frac{OD_{\text{GRUPO EXPERIMENTAL}}}{Cutoff}$$

Valores acima de 1,2 foram considerados positivos.

### 3.21. Análise Estatística

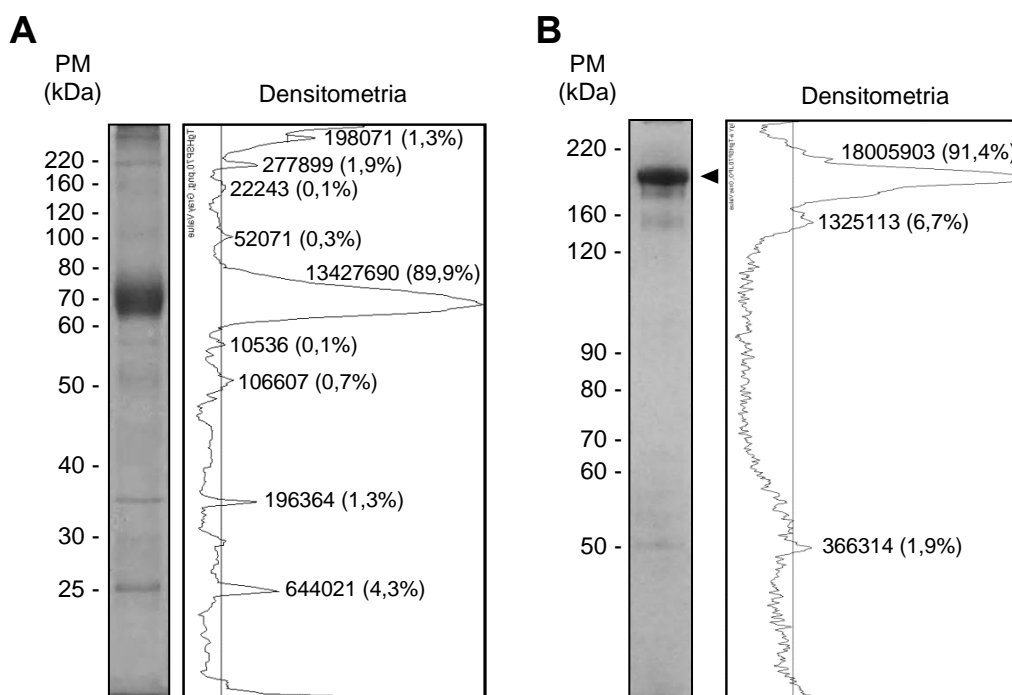
Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Os grupos dentro de cada linhagem foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) e analisados posteriormente pela análise da variância (ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis para amostras paramétricas e não-paramétricas, respectivamente. Quando houve diferença estatística, os dados foram submetidos ao post-teste de Bonferroni ou Dunnet para amostras paramétricas e não-paramétricas, respectivamente. A análise entre as linhagens de camundongos foi feita pelo teste *t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. RESULTADOS

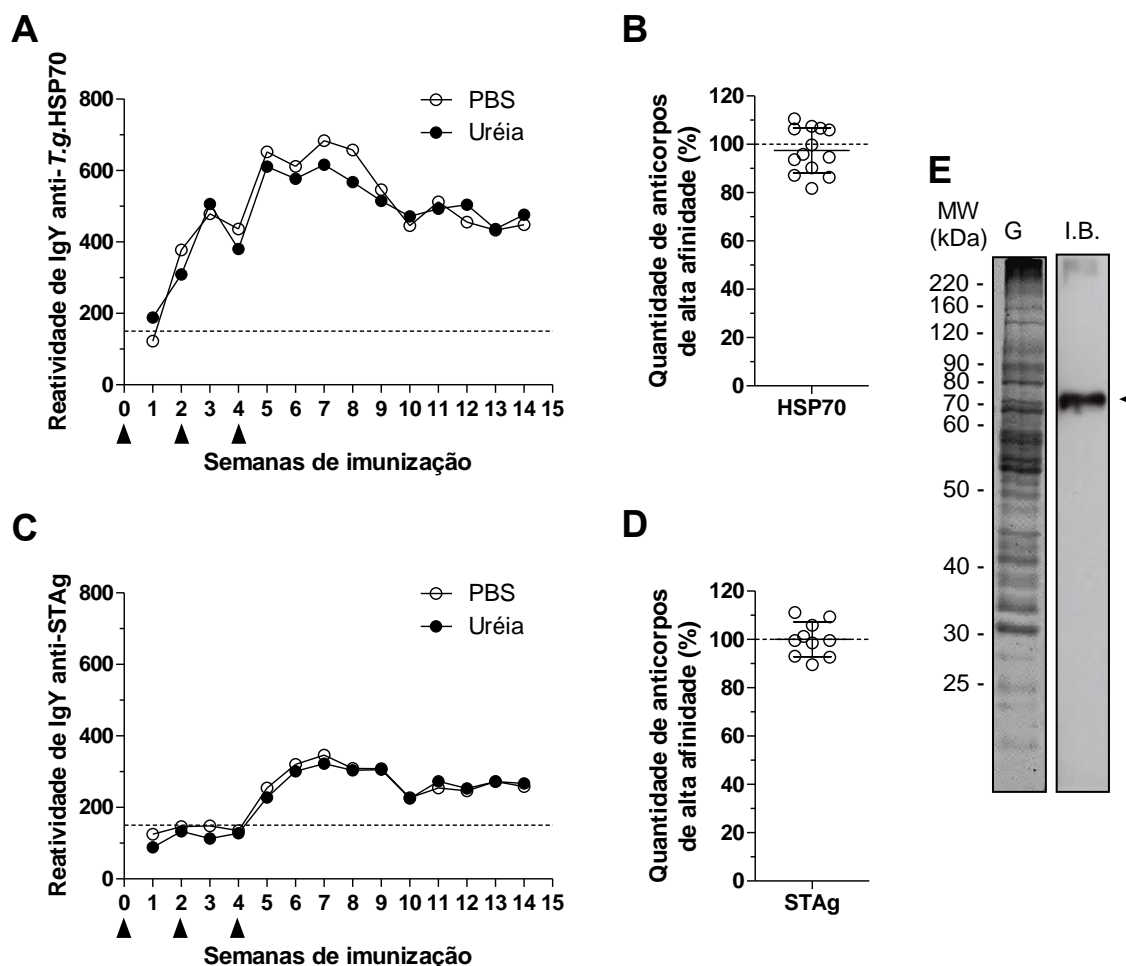
### 4.1. Galinhas imunizadas produzem anticorpos IgY de alta afinidade específicos anti-*TgHSP70*

Com a finalidade de produzir grandes quantidades de *TgHSP70* para ensaios de imunolocalização, detecção de anticorpos, CI no soro de animais infectados, imunização de animais e imunização de galinhas para produção de anticorpos IgY específicos, a proteína recombinante foi expressa em *E. coli*. Com o protocolo usado nestes experimentos, foi obtido *TgHSP70* com cerca de 90 % de pureza (Figura 1A). Esta proteína foi então utilizada para imunização de galinhas e os ovos coletados foram utilizados para extração de IgY, no qual cada 1 g de gema submetida a delipidação e precipitação de IgY resultou em amostras de 1 mL contendo aproximadamente 3 mg/mL de IgY com 91,4 % de pureza (Figura 1B).

Em seguida, amostras individuais de IgY purificada de cada semana de imunização foram testadas para detecção de *TgHSP70* recombinante (*rTgHSP70*) ou *TgHSP70* nativa (*nTgHSP70*) presente em STAg. Ensaios ELISA foram realizados utilizando placas sensibilizadas com *TgHSP70* ou com STAg. Além disso, metade das placas foi tratada com uréia para observar a afinidade dos anticorpos. Anticorpos IgY específicos anti-*rTgHSP70* foram inicialmente detectados após a segunda semana após a imunização e atingiram a reatividade máxima na quinta semana de imunização. Entre a oitava e a décima semanas foi observado a redução dos níveis da IgY anti-*rTgHSP70*, persistindo até a décima quarta semana de imunização (Figura 2A). Além disso, as amostras possuem porcentagem de anticorpos de alta avidéz em torno de 97 % (Figura 2B). Em paralelo, verificamos se a IgY específica obtida seria capaz de detectar *TgHSP70* presente em STAg. Foi observado que IgY purificada reconhece proteínas presentes em STAg após a quinta semana de imunização (Figura 2C). De forma semelhante, a proporção de anticorpos IgY de alta afinidade anti-STAg é semelhante à da anti-*TgHSP70*, cerca de 98 % (Figura 2D). A seguir, fizemos um *pool* com as amostras de IgY com maiores níveis de anticorpos anti-*TgHSP70* (da quinta a oitava semana de imunização), bem como as amostras antes da imunização (controle isotópico) para serem utilizados nos ensaios de *immunoblotting* e imunofluorescência. Verificamos por *immunoblotting* que anticorpos IgY anti-*TgHSP70* reage especificamente contra uma proteína de 70 kDa presente no STAg (Figura 2E). Estes dados sugerem que os anticorpos IgY produzidos são de alta avidéz e são também específicos para a detecção de *TgHSP70* presente no extrato de *T. gondii*.



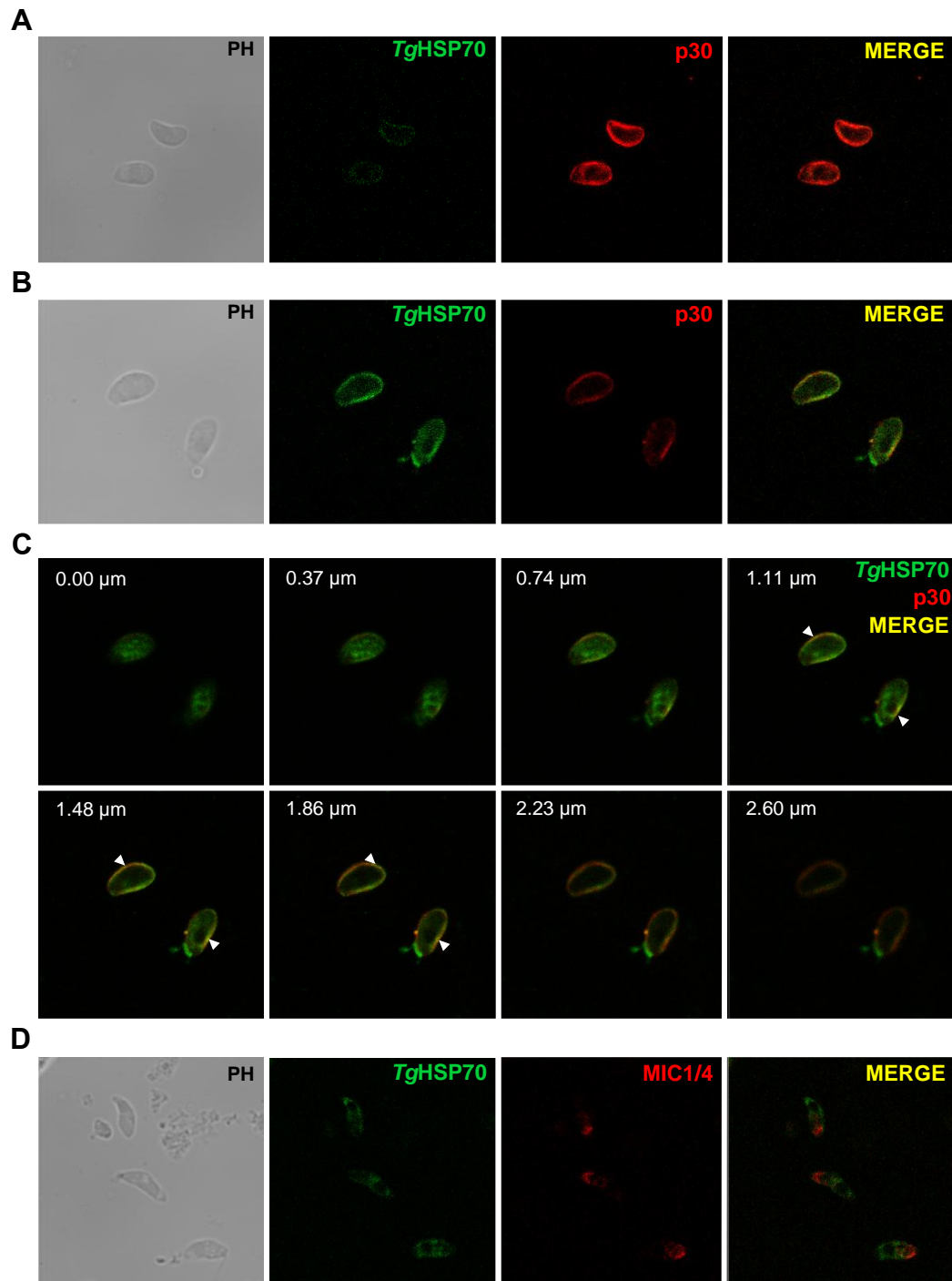
**Figura 1.** Amostras de TgHSP70 e IgY anti-TgHSP70 possuem aproximadamente 90 % de pureza. A TgHSP70 foi clonada e extraída de *E. coli* e submetida a cromatografia de afinidade e remoção de LPS em coluna de polimixina B. A fração purificada obtida foi separada em SDS-PAGE 10% e analisada pelo programa Image J®, indicando que aproximadamente 90 % do conteúdo proteico da fração foi TgHSP70 (A). Em seguida, a fração foi emulsificada em ACF e utilizada para imunização de galinhas Leghorn. As gemas dos ovos coletados foram submetidas à delipidização e purificação de IgY por precipitação com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A amostra coletada foi separada em SDS-PAGE 8 % e analisada pelo programa Image J®, resultando em amostras contendo IgY (180 kDa; seta) com cerca de 91 % de pureza (B). Os géis foram corados com coomassie G-250. PM, peso molecular; kDa, kilodaltons.



**Figura 2.** Anticorpos IgY específicos possuem elevada afinidade e especificidade na detecção de *TgHSP70*. Amostras semanais de IgY purificadas de gemas de ovos foram analisadas por ELISA utilizando placas sensibilizadas com *TgHSP70* recombinante e com STAg. Além disso, metade das placas foram incubadas com uréia 6 M como agente caotrópico entre antígeno-anticorpo. Para tanto, anticorpos IgY obtidos apresentaram reatividade contra *TgHSP70* (A) e possuem elevada afinidade com o antígeno (B). A reatividade dos anticorpos IgY anti-*TgHSP70* detectado em STAg foi menor (C), embora os anticorpos ainda apresentassem elevada afinidade (D). As setas no eixo inferior indicam as semanas em que as galinhas foram imunizadas. A linha tracejada indica a média da reatividade de IgY provinda de amostras antes da imunização. O antígeno STAg foi separado em gel SDS-PAGE 10 % (E, painel esquerdo), transferido para membrana de PVDF e submetido à reação de *immunoblotting* utilizando IgY anti-*TgHSP70* como anticorpo de detecção, mostrando que a IgY apresenta reatividade à uma proteína de 70 kDa (seta) presente no STAg (E, painel direito). G, gel corado por coomassie; I.B., *immunoblotting*.

#### 4.2. *TgHSP70* está presente no citoplasma de taquizoítas

A seguir utilizando o anticorpo IgY anti-*TgHSP70* foi verificado a localização intracelular dessa proteína em taquizoítas das cepas RH e ME-49 de *T. gondii*. Para tal, ensaios de imunofluorescência foram realizados com ou sem o passo de permeabilização. Foi feita dupla marcação utilizando a IgY anti-*TgHSP70* e anticorpo monoclonal anti-p30 (A3A4), para verificar se *TgHSP70* colocaliza com p30. Nas lâminas não permeabilizadas foi observado marcação somente da proteína p30 (Figura 3A) enquanto que nas lâminas permeabilizadas ambas as marcações foram visualizadas, inclusive sobrepondo na região próxima à membrana plasmática (Figura 3B). Para observar com mais detalhes, foi feito cortes no plano fluorescente (*z-stack*) por microscopia confocal (Figura 3C). Em seguida, foi realizada marcações de imunofluorescência utilizando proteínas presentes no complexo de micronemas (MIC1/4), embora *TgHSP70* não parece estar colocalizada estas proteínas (Figura 3D).

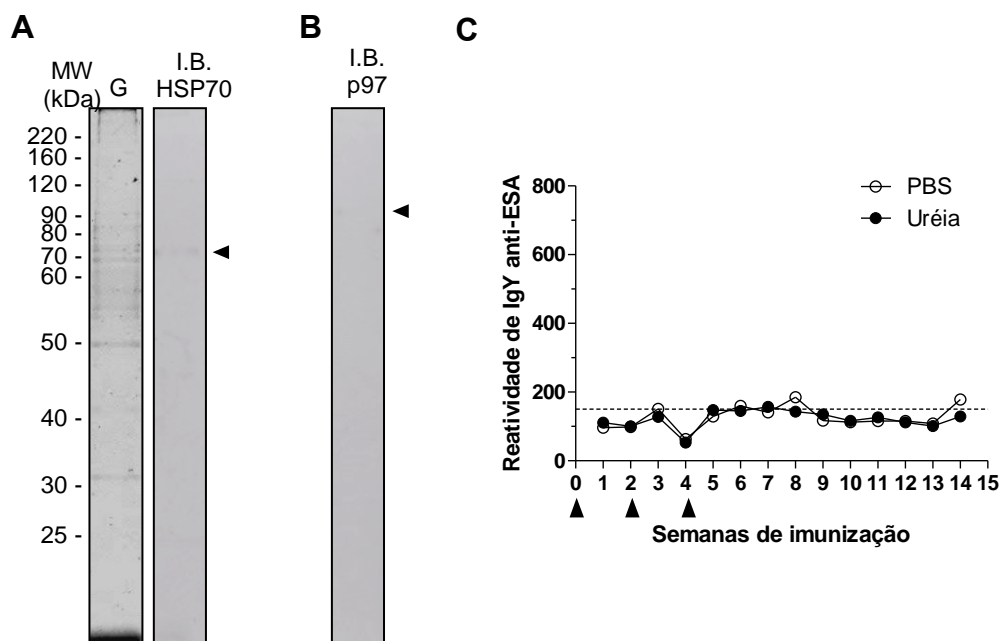


**Figura 3.** *TgHSP70* está presente no citoplasma de taquizoítas e colocaliza internamente com a membrana plasmática. Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* coletados do peritônio de camundongos foram fixados e submetidos à reação de imunofluorescência. Houve fraca marcação pela IgY nas lâminas não permeabilizadas enquanto que houve intensa marcação com p30 (A). O tratamento das lâminas com Triton-X 100 permite a marcação de *TgHSP70* citoplasmática, a qual está colocalizada com p30 (B). A análise por *Z-stack* foi feita para melhor definição das marcações sobrepostas (C). Também foi feita a marcação para MIC1/4, mostrando que *TgHSP70* não colocaliza com micronemas (D). Setas indicam regiões de imunolocalização das fluorescências.

### 4.3. *TgHSP70* não é secretada por taquizoítas

Outro ponto a ser investigado foi se a *TgHSP70* poderia ser secretada por *T. gondii*. Foram realizados ensaios de *immunoblotting* para detecção de *TgHSP70* no antígeno excretado-secretado (ESA) de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Porém, *TgHSP70* não foi detectada no ESA (Figura 4A).

Para assegurar a qualidade do ESA, foi também realizado *immunoblotting* para detecção da proteína citoplasmática p97, indicando que o ESA possuía quantidade mínima de parasitas lisados (Figura 4B). De fato, os anticorpos IgY anti-*TgHSP70* não possuem níveis de reatividade significantes nos ensaios ELISA utilizando placas sensibilizadas com ESA (Figura 4C).

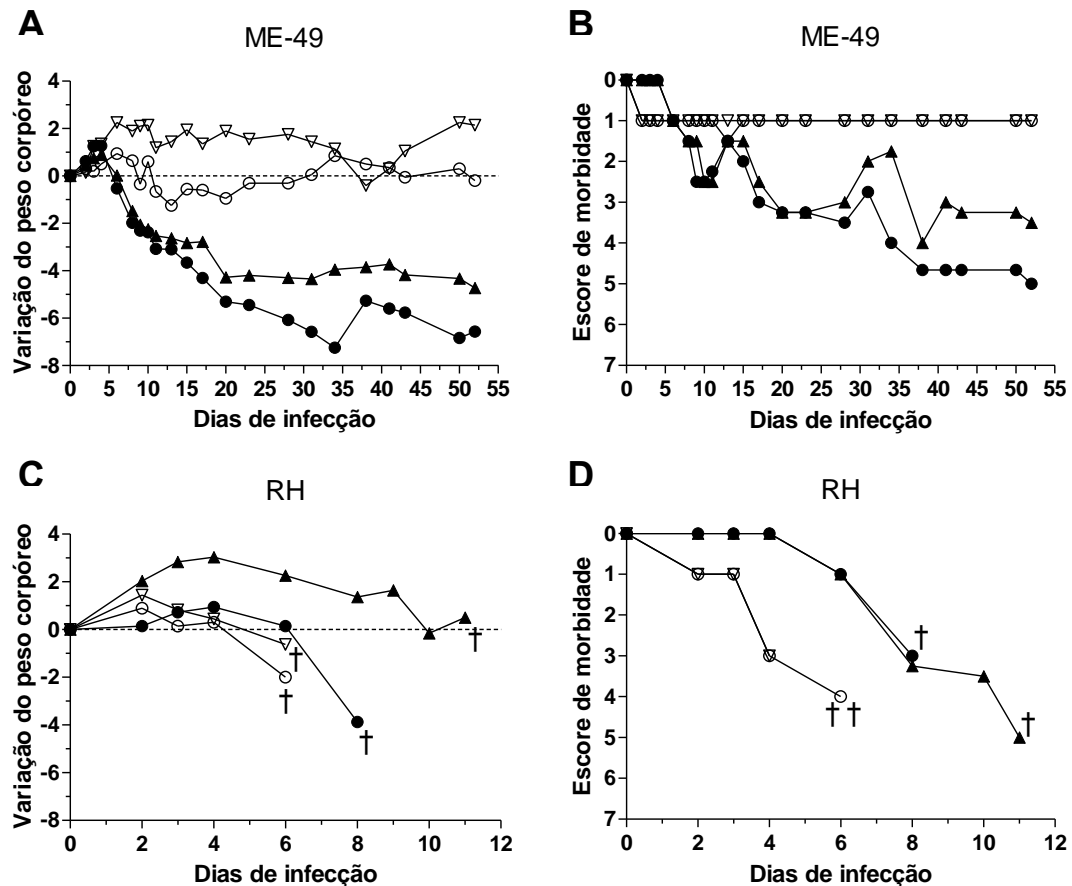


**Figura 4.** Taquizoítas de *T. gondii* não secretam *TgHSP70*. ESA obtido de parasitos da cepa RH de *T. gondii* foi separado em SDS-PAGE 10 % (**A**, **painel direito**) e foi transferido para membrana de PVDF, a qual foi submetida ao ensaio de *immunoblotting* utilizando IgY purificada, não revelando marcações na altura de 70 kDa (**A**, **painel esquerdo**). Não houve a detecção de p97 no ESA (**B**), indicando que as proteínas contidas no ESA eram estritamente excretadas-secretadas pelo parasita. Amostra de IgY anti-*TgHSP70* purificada também não reage contra o ESA por ensaio ELISA (**C**). Setas indicam fraca marcação nos pesos de 70 e 97 kDa, indicando baixa lise de parasitas durante o preparo do ESA.



#### **4.4. Imunização de camundongos com *TgHSP70* não protege contra infecção por *T. gondii***

Para avaliar o papel da *TgHSP70* como uma ferramenta para imunização contra a toxoplasmose, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados com *TgHSP70* e avaliados quanto a perda de peso e sinais de morbidade após a infecção com *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 imunizados com *TgHSP70* ou tratados com o veículo (PBS) começaram a perder peso até o 20º dia de infecção pela cepa ME-49 (tipo II, baixa virulência) enquanto que camundongos BALB/c mantiveram o peso durante o curso da infecção (Figura 5A). Além disso, observou-se que camundongos C57BL/6 começaram a apresentar sinais de morbidade como pelo arrepiado e dificuldade de locomoção com o decorrer da infecção enquanto que camundongos BALB/c não apresentaram variação do escore de morbidade (Figura 5B). Em contrapartida, a infecção de ambas as linhagens de camundongos com a cepa RH (tipo I, alta virulência) levou a perda de peso significativa entre os grupos (Figura 5C). Porém, estes animais adquiriram sinais de morbidade rapidamente levando a morte destes entre 6 a 11 dias após a infecção (Figura 5D). Estes resultados mostram que a imunização com *TgHSP70* não melhora a sobrevivência ou sinais de morbidade de camundongos infectados.

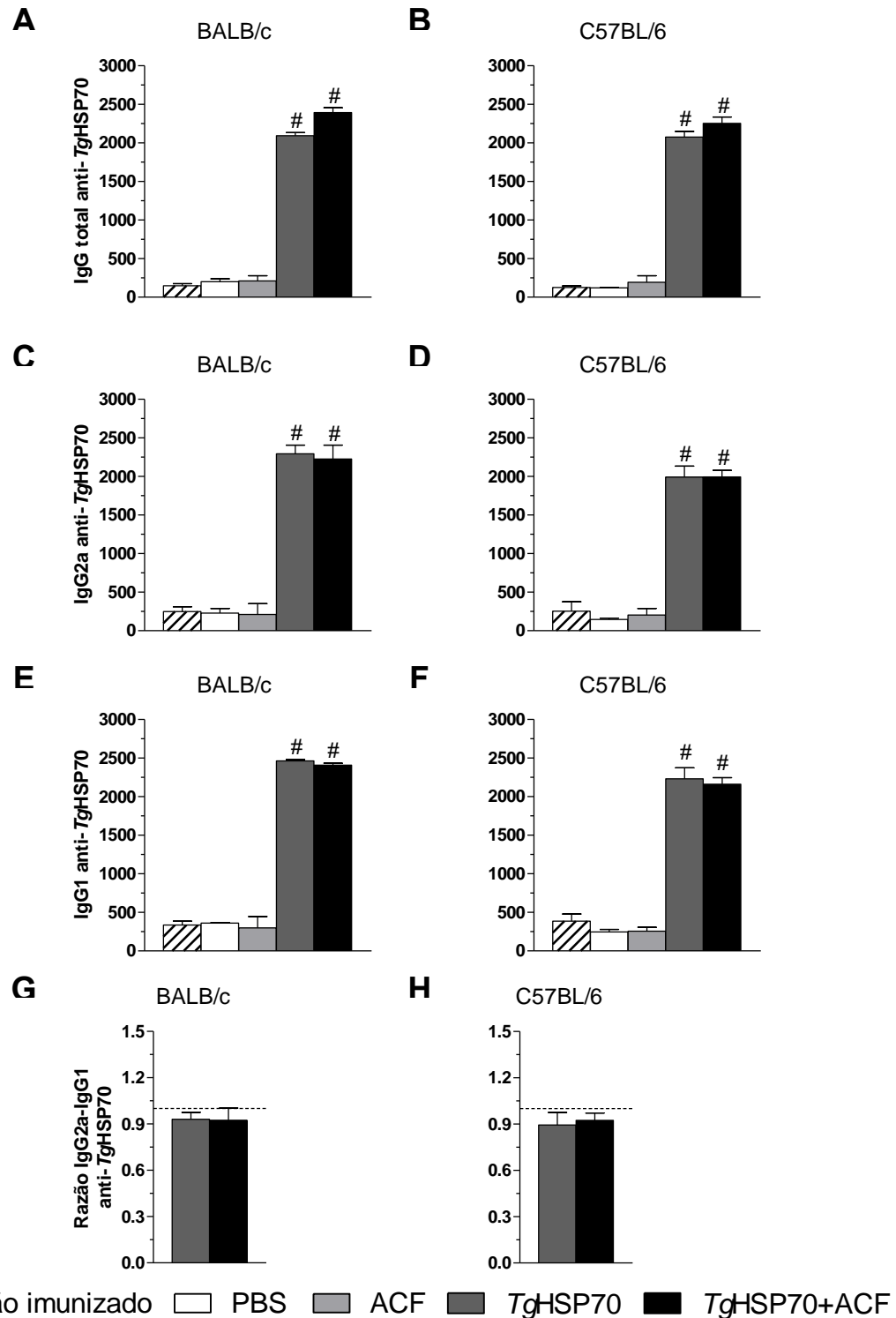


● C57BL/6 PBS ▲ C57BL/6 HSP70 ○ BALB/c PBS ▽ BALB/c HSP70

**Figura 5.** A imunização de camundongos com rTgHSP70 não protege contra infecção por *T. gondii*. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados com TgHSP70 e foram infectados com 10 cistos da cepa ME-49 (A e B) ou 100 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* (C e D). Camundongos C57BL/6 perderam peso progressivamente enquanto que camundongos BALB/c mantiveram o peso corpóreo constante durante o tempo de infecção pela cepa ME-49 (A). A alteração do escore de morbidade acompanhou a perda de peso pelos animais, de modo que camundongos C57BL/6 apresentavam progressivamente mais sinais de morbidade com o decorrer da infecção (B). Camundongos BALB/c e C57BL/6 perderam peso com o decorrer da infecção e morreram entre 6 e 11 dias após a infecção com a cepa RH (C). Rapidamente tanto os camundongos BALB/c quanto C57BL/6 adquiriram sinais de debilitação e morreram (D). †, dia em que todos os animais do grupo estavam mortos.100 -

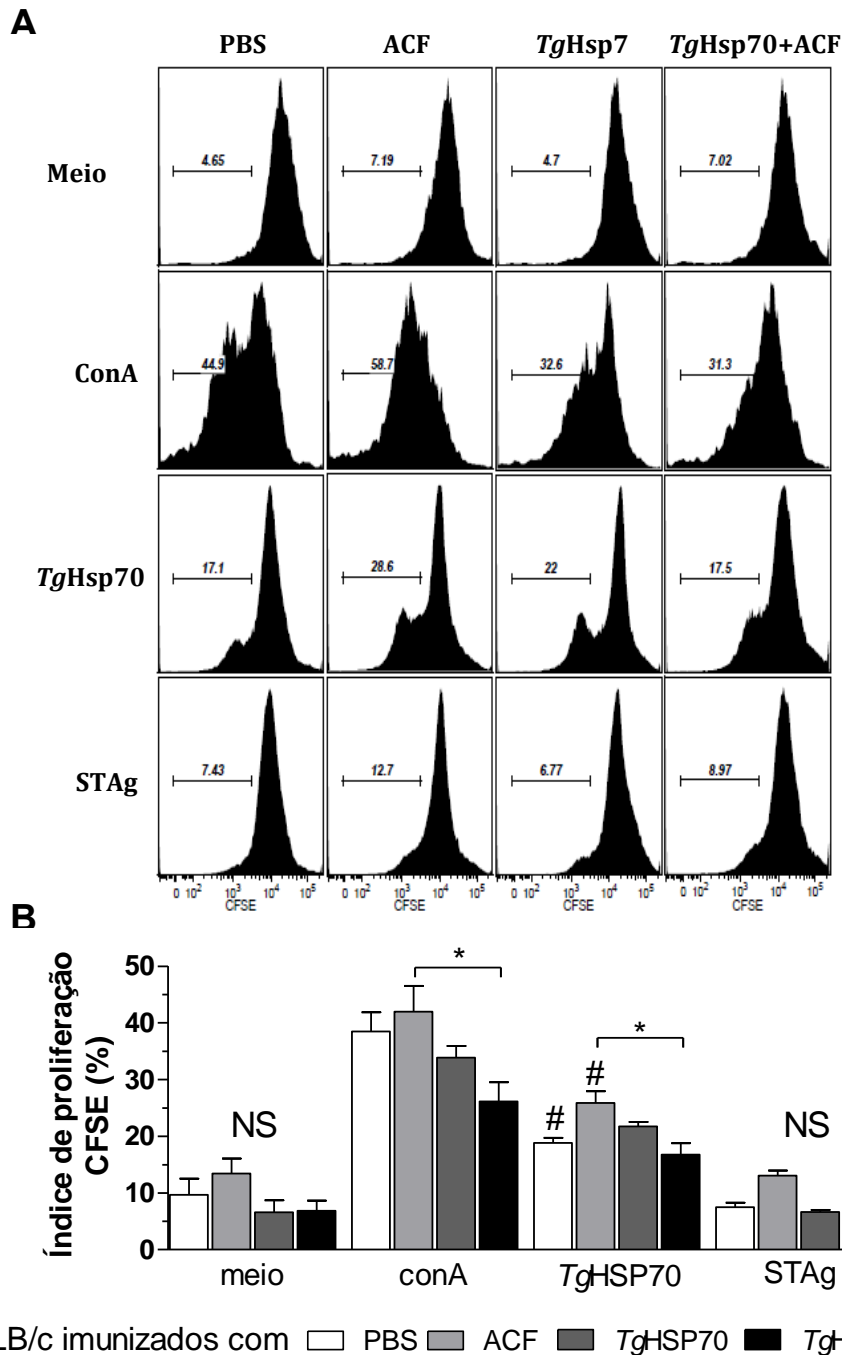
#### 4.5. *TgHSP70* induz produção de anticorpos IgG anti-*TgHSP70* independente de ACF

O próximo passo foi avaliar a produção de anticorpos por camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados com *TgHSP70* adicionado ou não de adjuvante completo de Freund (ACF). O soro dos animais foi testado para detecção de IgG total, IgG2a e IgG1 anti-*TgHSP70* por ELISA. A imunização com ou sem ACF não teve influência significativa na reatividade dos anticorpos anti-*TgHSP70* tanto nos camundongos BALB/c (Figura 6A) quanto nos camundongos C57BL/6 (Figura 6B), uma vez que camundongos imunizados somente com *TgHSP70* apresentaram também níveis elevados de anticorpos específicos. Não obstante, camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados com *TgHSP70* sem adjuvantes obtiveram elevada reatividade de IgG2a (Figura 6C e 6D) bem como IgG1 (Figura 6E e 6F) anti-*TgHSP70*. Não obstante, a razão entre a reatividade de IgG2a e IgG1 anti-*TgHSP70* foi aproximadamente 1 (Figura 6G a 6H). Estes resultados sugerem que *TgHSP70* não necessita ACF para estímulo da produção de anticorpos e também não leva a polarização da resposta humoral de anticorpos para perfil Th1 nem Th2.



#### 4.6. *TgHSP70* estimula a proliferação de células do baço de camundongos não imunizados

Com objetivo de avaliar os efeitos da imunização com *TgHSP70* adicionada ou não de ACF em camundongos BALB/c. Foi feita a coleta das células do baço para análise do índice de proliferação por meio de marcação com CFSE por citometria de fluxo. Uma vez em cultura, as células foram reestimuladas com meio, concanavalina A (conA), *TgHSP70* ou STAg (Figura 7A). A incubação das células com o meio não foi capaz de estimular a proliferação celular (Figura 7B, meio) como observado quando as células foram incubadas com conA (Figura 7B, conA). Por sua vez, células provindas de camundongos imunizados com *TgHSP70* emulsificada em ACF possuem menor índice de proliferação quando comparado às células do grupo tratado somente com ACF. Entretanto, *TgHSP70* apenas foi capaz de induzir proliferação de células de baço de animais não imunizados, como pode ser observado em animais tratados com PBS e células de baço sem estímulo (meio) e estimuladas com *TgHSP70* ( $P < 0.0058$ , teste t) (Figura 7B, meio e *TgHSP70*). Porém, observou-se uma redução da proliferação das células de animais do grupo *TgHSP70*+ACF em relação ao grupo imunizado apenas com ACF, quando as células foram reestimuladas com *TgHSP70* (Figura 7B, *TgHSP70*) e em menor intensidade sob reestímulo com STAg (Figura 7B, STAg). Estes dados sugerem que células do baço de camundongos não imunizados apresentam aumento na proliferação quando estimuladas com *TgHSP70*. Além disso, o estímulo com *TgHSP70* de células do baço de camundongos imunizados com *TgHSP70* juntamente com ACF reduz a proliferação destas células, indicando o papel duplo da *TgHSP70* de estímulo e modulação da proliferação celular.



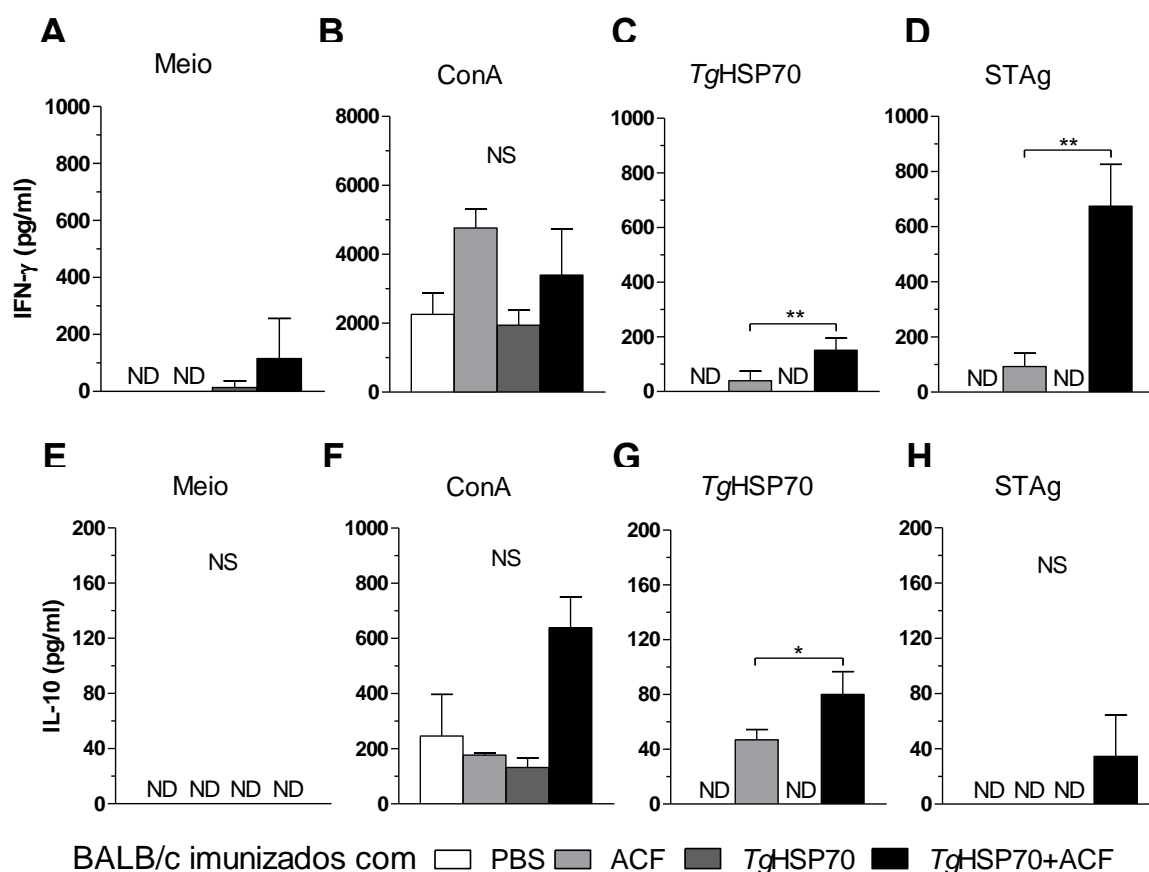
**Figura 7.** Estimulação com TgHSP70 induz proliferação de células do baço de camundongos BALB/c não imunizados. Camundongos BALB/c foram tratados com PBS, ACF, TgHSP70 ou TgHSP70 juntamente com ACF a cada 15 dias e sacrificados aos 45 dias de imunização para coleta do baço para análise de proliferação com CFSE por citometria de fluxo. As células do baço foram cultivadas e reestimuladas com meio, conA, STAg ou TgHSP70 (A). Estimulação das células com meio de cultura não induz proliferação de células (B, meio). A reestimulação com conA das células do baço de camundongos do grupo TgHSP70+ACF reduz a proliferação das células deste grupo em relação ao grupo imunizado com ACF (B, conA). A reestimulação com TgHSP70 induziu a proliferação de células do baço de camundongos não imunizados com TgHSP70 e reduziu também a proliferação das células do grupo TgHSP70+ACF em relação aos grupo imunizado com ACF (B, TgHSP70). A reestimulação com STAg não promoveu aumento da proliferação (B, STAg). Os grupos foram analisados por ANOVA. NS, sem diferença estatística. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ .

#### 4.7. *TgHSP70* não estimula produção de IFN- $\gamma$ e IL-10 em células do baço murinas

Além de avaliar a proliferação das células do baço, também foi avaliada a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 no sobrenadante das células do baço de camundongos BALB/c imunizados ou não com *TgHSP70* e/ou ACF. Células do baço de animais do grupo *TgHSP70*+ACF não estimuladas *in vitro* (meio) apresentam níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  (Figura 8A). Em contrapartida, a incubação das células com conA estimula a produção de IFN- $\gamma$  principalmente nos grupos onde foi utilizado ACF para imunização (Figura 8B). Entretanto, o estímulo com conA parece reduzir a produção de IFN- $\gamma$  no grupo *TgHSP70*+ACF quando comparado com o grupo somente tratado com ACF. Porém, o reestímulo com *TgHSP70* das células provindas do grupo *TgHSP70*+ACF provocou um pequeno aumento na produção de IFN- $\gamma$  (Figura 8C) enquanto que quando estímulo com STAg provocou um aumento na produção de IFN- $\gamma$  (Figura 8D).

Não foi possível detectar a produção de IL-10 em células não tratadas (meio) (Figura 8E). Quando estimuladas com conA, as células do grupo *TgHSP70*+ACF produziram mais IL-10 do que as células do grupo imunizado com ACF (Figura 8F). Não obstante, as células do grupo *TgHSP70*+ACF produziram níveis significativos ao serem reestimuladas com *TgHSP70* (Figura 8G) ou estimuladas com STAg (Figura 8H).

Além disso, estes experimentos mostram também que a imunização de animais com *TgHSP70* sem ACF não é capaz de estimular a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, pois em nenhuma das condições analisadas foi verificado aumento na produção destas citocinas (Figura 8C, 8D, 8G e 8H).



**Figura 8.** Reestímulo com *TgHSP70* induz produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 pelas células do baço de camundongos BALB/c imunizados com *TgHSP70*. Camundongos BALB/c foram imunizados com PBS, ACF, *TgHSP70* ou *TgHSP70* juntamente com ACF a cada 15 dias e sacrificados aos 45 dias de imunização para coleta do baço para análise da produção de IFN- $\gamma$  (A a D) e IL-10 (E a H) no sobrenadante por ELISA. As células do baço foram cultivadas e reestimuladas com conA, STAg ou *TgHSP70*. Células não estimuladas in vitro apresentam leve produção de IFN- $\gamma$  pelo grupo *TgHSP70*+ACF (A) enquanto que nas células tratadas com conA o grupo *TgHSP70*+ACF parece ter redução da produção de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo ACF (B). O reestímulo das células com *TgHSP70* induz a produção de IFN- $\gamma$  (C) enquanto que o reestímulo com STAg leva a produção de IFN- $\gamma$  mas sem diferença significativa com o grupo ACF (D). Não foi detectados níveis significantes de IL-10 nas células tratadas com meio (E). Contudo, nas células tratadas com conA, o grupo *TgHSP70*+ACF parece induzir a produção de IL-10 (F). Este efeito também é observado quando as células são reestimuladas com *TgHSP70* de forma significativa (G). Além disso, o reestímulo com STAg também induz leve produção de IL-10 pelas células do grupo *TgHSP70*+ACF (H). A comparação entre os grupos foi feita por ANOVA. ND, não detectado. NS, sem diferença estatística. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ .



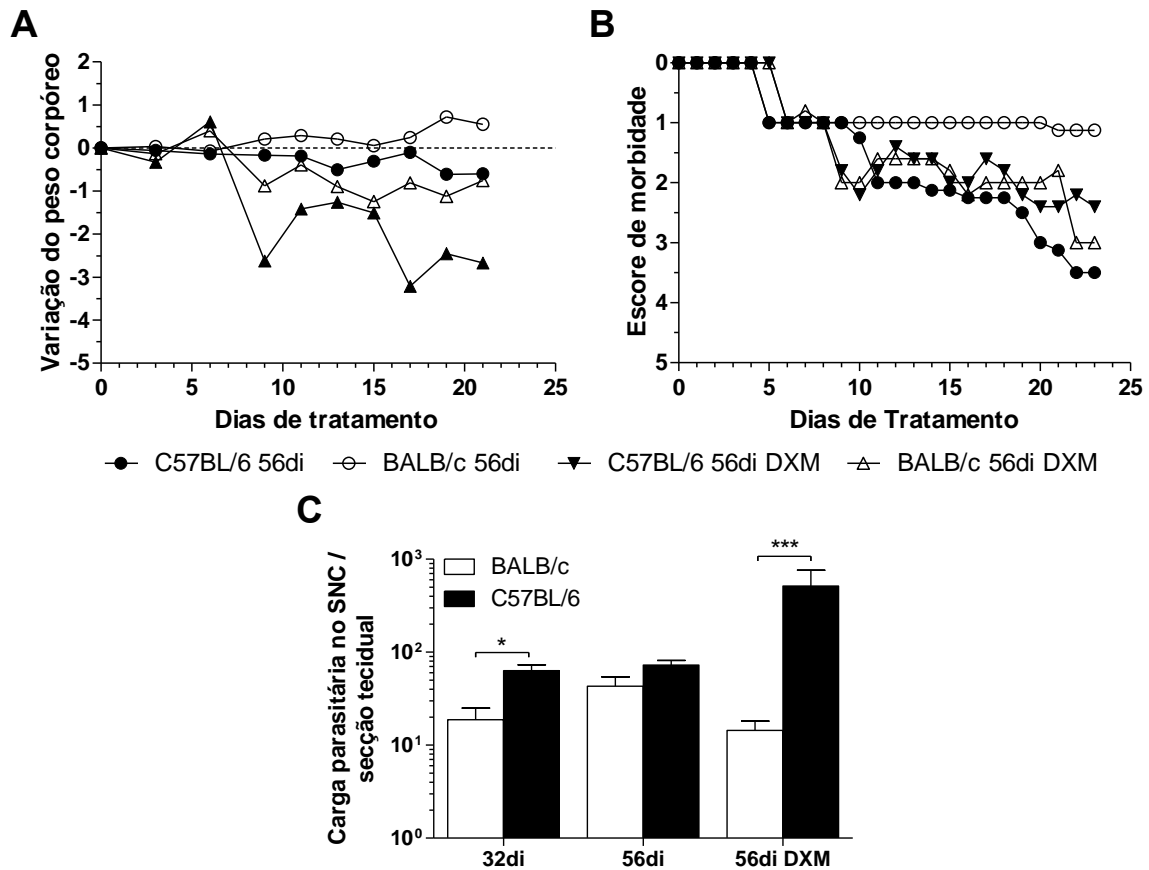
#### 4.8. Tratamento com DXM aumenta carga parasitária e reduz inflamação no cérebro de camundongos C57BL/6

Para avaliar o perfil da expressão de *TgHSP70 in vivo*, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram infectados com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. No 32º dia após a infecção, iniciou-se o tratamento com DXM. No caso dos camundongos infectados por 56 dias (56di) e naqueles infectados por 32 dias e tratados mais 24 dias com DXM (56di DXM), os animais foram analisados quanto ao peso e quanto aos escores de morbidade durante o período de tratamento com a droga. Nenhum dos animais tratados com a droga morreu durante o tratamento. Tais animais apresentaram gradativamente um aumento na ereção dos pelos, começando após o 5º dia de tratamento (escores 1 e 2), seguido de perda de peso, tanto para os camundongos BALB/c quanto para os animais C57BL/6 (escore 3), e diminuição da atividade motora dos camundongos C57BL/6 nos últimos dias de tratamento (escore 4) (Figura 9A). A partir do primeiro dia em que o camundongo apresentou-se com a pelagem eriçada, observa-se a perda de peso nos dias subsequentes. Para tanto, a queda de massa corpórea está associada com o aumento da morbidade dos animais (Figura 9B).

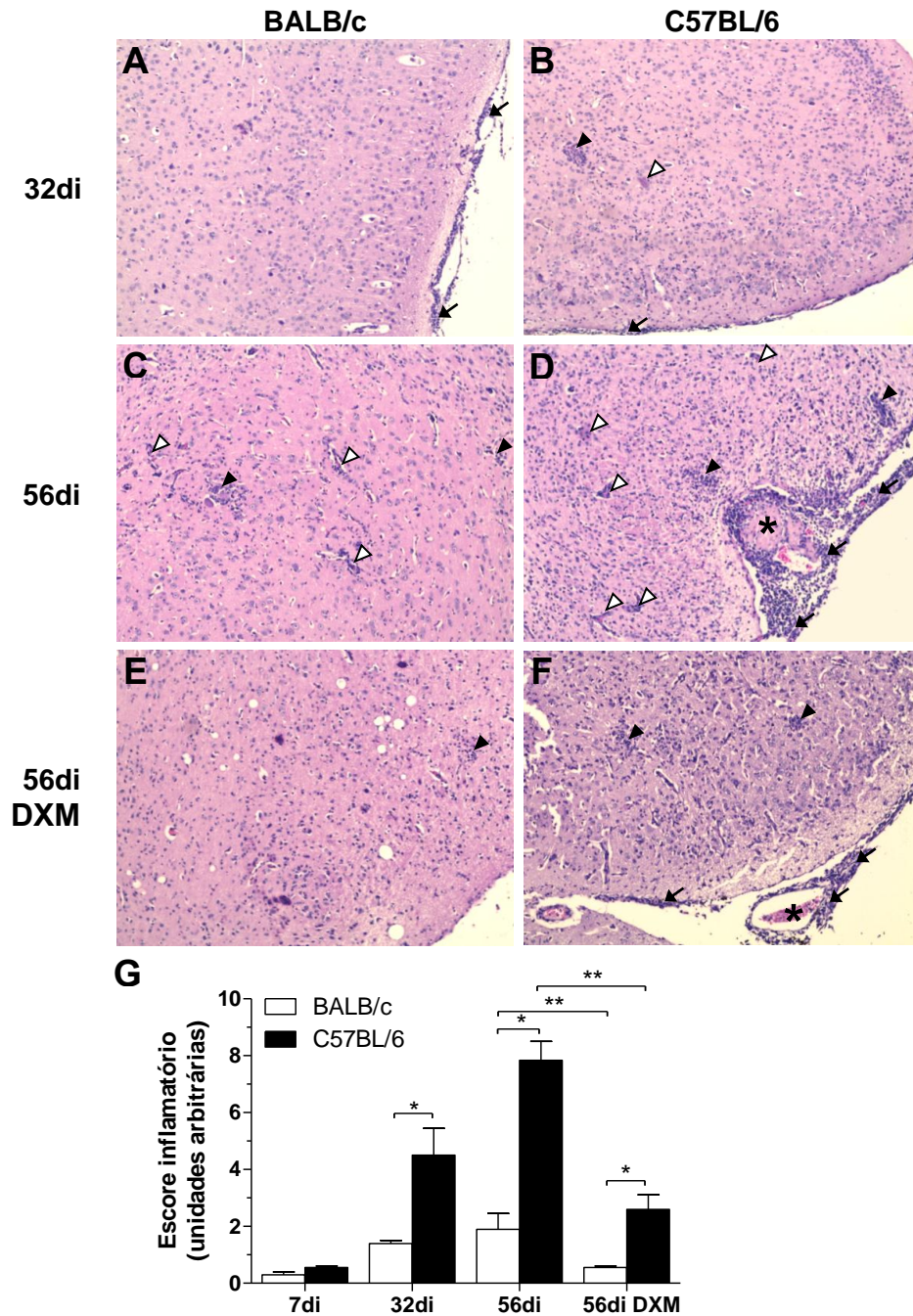
Em camundongos C57BL/6, verificou-se um aumento gradual da carga parasitária no cérebro. Camundongos C57BL/6 infectados durante 56di e tratados com DXM apresentaram uma carga parasitária quase 2 vezes maior que aqueles aos 32 dias de infecção (Figura 9C, barras pretas). Em contrapartida aos camundongos C57BL/6, os camundongos BALB/c apresentaram um aumento da carga parasitária até os 32 dias de infecção com posterior redução aos 56 dias com o tratamento com DXM. Os camundongos infectados durante 56di e tratados com DXM apresentaram carga parasitária 3 vezes menor que camundongos aos 32 dias de infecção (Figura 9C, barras brancas). Apesar de não apresentar diferença estatística, observou-se que camundongos C57BL/6 apresentaram uma maior carga parasitária no cérebro, quando comparado aos camundongos BALB/c. Entretanto, aos 56 dias de infecção e 24 dias de tratamento com DXM, observou-se um intenso parasitismo tecidual no cérebro de camundongos C57BL/6 e esta carga parasitária foi 8 vezes maior no órgão desses animais em comparação aos animais BALB/c ( $t=9,686$ ;  $p=0,023$ ) (Figura 9C).

As alterações histológicas no cérebro dos animais foram observadas em secções teciduais coradas por Hematoxilina e Eosina. Houve o aumento progressivo da resposta inflamatória em relação ao tempo em que os animais permaneceram infectados: aos 7 dias de infecção, foram observados raros e pequenos infiltrados inflamatórios no cérebro de ambas as linhagens de camundongos; já aos 32 dias de infecção, camundongos BALB/c apresentaram

lesões mais brandas em comparação aos animais C57BL/6 no mesmo período de infecção (Figura 10A). Os animais C57BL/6 apresentaram infiltrados inflamatórios constituídos principalmente por células mononucleadas e estes foram mais numerosos em relação aos 7 dias de infecção, presença de manguitos perivasculares e infiltrados de células inflamatórias nas meninges (Figura 10B); aos 56 dias de infecção, os animais BALB/c apresentaram lesões similares aquelas visualizados aos 32 dias (Figura 10C), enquanto que nos camundongos C57BL/6 foi observado um grande aumento do número e do tamanho dos focos inflamatórios, presença de células inflamatórias espalhadas pelo parênquima, manguitos perivasculares e meningite, bem como presença de trombos (Figura 10D). O tratamento com DXM influenciou na resposta do animal ao parasita, de modo que houve redução do número e da quantidade de focos inflamatórios nos camundongos BALB/c (Figura 10E), assim como nos camundongos C57BL/6 (Figura 10F). Com exceção ao 7º dia de infecção, os camundongos C57BL/6 apresentaram lesões mais graves e em maior número quando comparados com camundongos BALB/c nas mesmas condições. Além disso, o tratamento com DXM reduziu as alterações histológicas dos animais infectados quando comparados com os animais infectados por 56 dias e não tratados (Figura 10G).



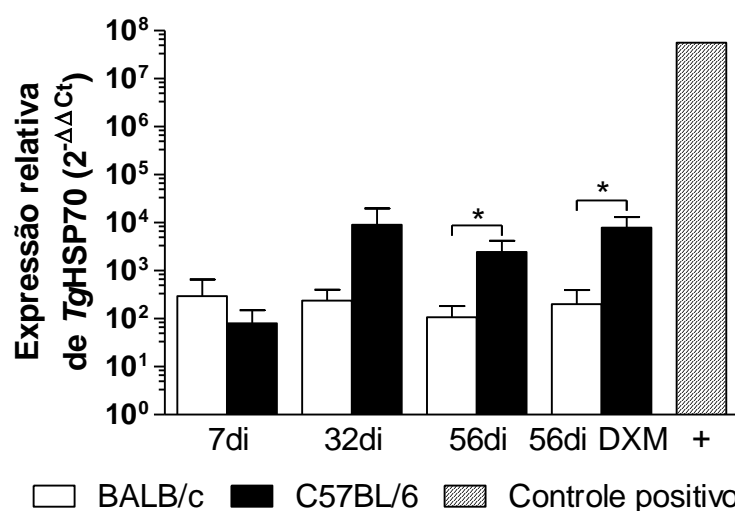
**Figura 9.** Tratamento com DXM aumenta carga parasitária em camundongos C57BL/6. Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por 32 dias foram tratados durante 24 dias adicionais para reativação da infecção. A partir do 9º dia de tratamento com DXM, os animais começaram a perder peso (**A**) e aumentaram os escores morbidade quando comparados aos camundongos somente infectados (**B**). A detecção do parasitismo foi avaliada pela contagem de estruturas semelhantes a cistos e vacúolos parasitóforos em secções do cérebro por imunohistoquímica para *T. gondii*. Observou-se aumento da carga parasitária com o passar do tempo de infecção e o tratamento com DXM reduziu a carga parasitária nos camundongos BALB/c e aumentou nos C57BL/6 (**C**). A comparação entre as linhagens foi feita pelo teste *t* de Student. \*,  $p < 0,05$ . \*\*\*,  $p < 0,001$ .



**Figura 10.** Tratamento com DXM reduz a inflamação no cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6. Cortes histológicos do cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por 32 e 56 dias e o grupo infectado por 56 dias e tratado com DXM foram corados por H&E e avaliados qualitativa e quantitativamente sob microscopia de luz. Aos 32 dias de infecção, animais BALB/c (A) apresentaram alterações histológicas mais brandas que os C57BL/6 (B). Aos 56 dias de infecção houve aumento da quantidade e do grau das lesões inflamatórias nos camundongos BALB/c (C) e principalmente nos C57BL/6 (D). O tratamento com DXM reduziu a quantidade de lesões inflamatórias tanto nos animais BALB/c (E) quanto nos C57BL/6 (F). As alterações histológicas observadas foram quantificadas seguindo escores arbitrários (G). Foco inflamatório (▲), manguito perivascular (△), trombo (\*), inflamação da meninge (◄). A análise entre os grupo dentro de cada linhagem foi feito pelo teste ANOVA enquanto que a análise entre as linhagens foi feita pelo teste *t* de Student. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ .

#### 4.9. Infecção por *T. gondii* estimula expressão de *TgHSP70* no cérebro

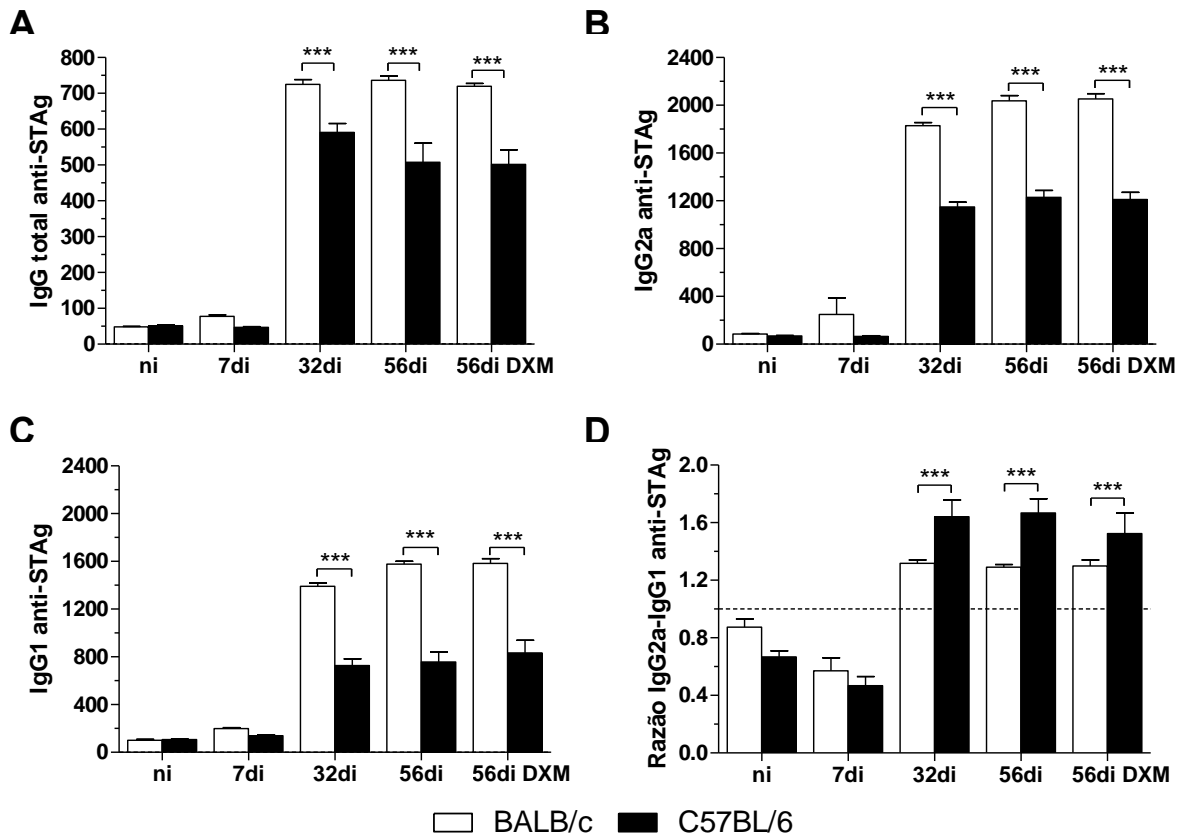
O cérebro dos camundongos infectados foi submetido a análise da expressão de *TgHSP70* por qPCR. Foi observado que a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir a expressão de *TgHSP70* tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6 uma vez que não foi detectada a proteína nos camundongos não infectados. Porém, camundongos infectados por 32 e 56 dias e no grupo infectado por 56 dias e tratado com DXM, observou-se maior expressão de *TgHSP70* em camundongos C57BL/6 do que em camundongos BALB/c (Figura 11).



**Figura 11.** Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados possuem maior expressão de *TgHSP70* no cérebro do que BALB/c. O cérebro dos camundongos experimentais infectados por 7, 32 e 56 dias e aqueles tratados com DXM foi submetido a extração de RNA e construção do cDNA para análise da expressão de *TgHSP70*. Os dados são expressos em relação aos camundongos não infectados pelo método do delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com *T. gondii* apresentam aumento na expressão de *TgHSP70* no cérebro do que camundongos BALB/c que mantém o nível de expressão durante o curso da infecção e durante o tratamento com DXM. +, controle positivo (RNA de  $8 \times 10^8$  taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*). A análise entre as linhagens foi feita pelo teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.10. Tratamento com DXM não reduz a reatividade dos anticorpos contra STAg

O soro dos animais experimentais foi testado por ELISA contra STAg para avaliação da soroconversão. Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por 7 dias possuem níveis baixos de anticorpos específicos contra *T. gondii*. Além disso, o tratamento com DXM não influenciou na concentração de anticorpos reativos contra STAg, uma vez que os níveis de reatividade não reduziu em relação aos animais infectados por 56 dias (Figura 12A). Além disso, foi avaliado se a imunossupressão com DXM poderia provocar alteração na proporção de anticorpos IgG2a/IgG1. Verificou-se que o tratamento não provocou alterações dos níveis de anticorpos IgG2a anti-STAg (Figura 12B) quanto de IgG1 anti-STAg (Figura 12B). Camundongos C57BL/6 apresentaram uma maior proporção de anticorpos IgG2a/IgG1 do que BALB/c nos grupos infectados por 32 e 56 dias e inclusive no grupo tratado com DXM. Porém, com exceção do grupo 7 dias infectado, não houve alteração significativa na proporção IgG2a/IgG1 entre os grupos cronicamente infectados dentro de cada linhagem durante o curso da infecção, inclusive nos grupos tratados com DXM (Figura 12D).



**Figura 12.** Tratamento com DXM não reduziu reatividade de anticorpos anti-STAg. O soro dos camundongos experimentais infectados por 7, 32 ou 56 dias e dos animais infectados por 56 dias e tratados com DXM foi submetido ao teste ELISA para verificação da reatividade contra antígenos de *T. gondii*. A partir do 32º dia de infecção, camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram níveis de anticorpos detectáveis contra STAg e este níveis não decresceram com o tempo de infecção (A). A produção de anticorpos anti-STAg pelos camundongos BALB/c foi maior em todos os grupos, inclusive das subclasses IgG2a (B) e IgG1 (C). Porém, a razão entre os níveis de anticorpos IgG2/IgG1 nos camundongos C57BL/6 foi maior (D). A comparação entre as linhagens foi feita pelo teste *t* de Student. \*\*\*,  $p < 0,001$ .

#### **4.11. Infecção por *T. gondii* promove aumento da concentração de *TgHSP70* circulante e formação de complexo imune (CI)**

Para determinação da quantidade de *TgHSP70* circulante no soro dos camundongos experimentais por ELISA sanduiche, foi primeiramente produzido anticorpo anti-*TgHSP70* no roedor *C. callosus* para ser utilizado como anticorpo de captura do antígeno. Desta forma, os animais foram imunizados com *TgHSP70* recombinante, os soros destes foram coletados para verificar a resposta imune humoral dos animais utilizando o teste ELISA. As amostras de soro começaram a apresentar reatividade a partir da quarta semana de imunização, atingindo o máximo de reatividade após 6 semanas e declinando 2 semanas depois (Figura 13). As amostras de soros dos animais com maior reatividade (4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de imunização) foram misturadas e submetidas a purificação de anticorpo em coluna de proteína G, resultando no isolamento da fração IgG anti-*TgHSP70* de *C. callosus*.

Ensaio ELISA sanduíche utilizando a IgY de galinha e a IgG de *C. callosus* foram desenvolvidos para detecção de *TgHSP70* circulante, anticorpos anti-*TgHSP70* e CI *TgHSP70*-anti-*TgHSP70* no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados e tratados ou não com DXM. Como controle dos experimentos, inoculamos camundongos BALB/c e C57BL/6 com cérebro de *C. callosus* não infectados (*sham*) e os analisamos em paralelo aos animais infectados, para verificar se o estresse de inoculação poderia intervir na produção de *HSP70* pelo hospedeiro.

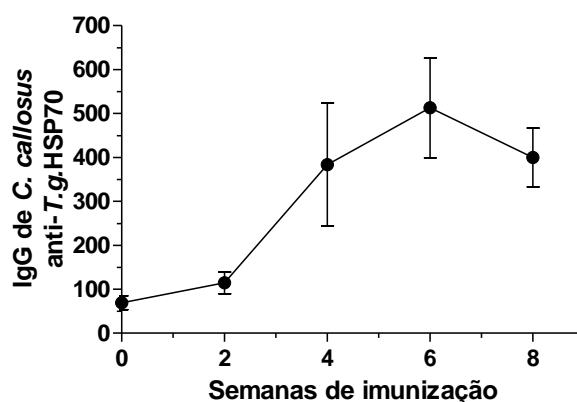
Para verificar a cinética de produção de anticorpos específicos anti-*TgHSP70* foi realizado o ensaio ELISA para detecção de anticorpos específicos no soro dos animais. Camundongos C57BL/6 apresentaram baixos níveis de IgG específica contra a *TgHSP70* no 7<sup>o</sup> e 56<sup>o</sup> dias de infecção quando comparados com aqueles com 32 dias de infecção. Nos animais tratados com DXM, a concentração de anticorpos foi um pouco mais elevada, embora sem diferença significativa dos restantes (Figura 14A, barras brancas). Em contrapartida, camundongos BALB/c apresentaram baixos níveis de IgG anti-*TgHSP70* aos 7 dias de infecção e níveis crescentes aos 32 e 56 dias após a infecção. Os camundongos infectados por 56 dias e tratados com DXM apresentaram menores taxas de anticorpos anti-*TgHSP70* do que aqueles com o mesmo tempo de infecção e não tratados, mas sem diferença significativa (Figura 14A, barras pretas). Ao comparar as linhagens, observou-se que os níveis de anticorpos contra *TgHSP70* são semelhantes entre as linhagens aos 7 e 32 dias após a infecção e no grupo de animais tratados com DXM. Porém, no grupo infectado por 56 dias, os camundongos BALB/c apresentaram maiores níveis de anticorpos do que os camundongos



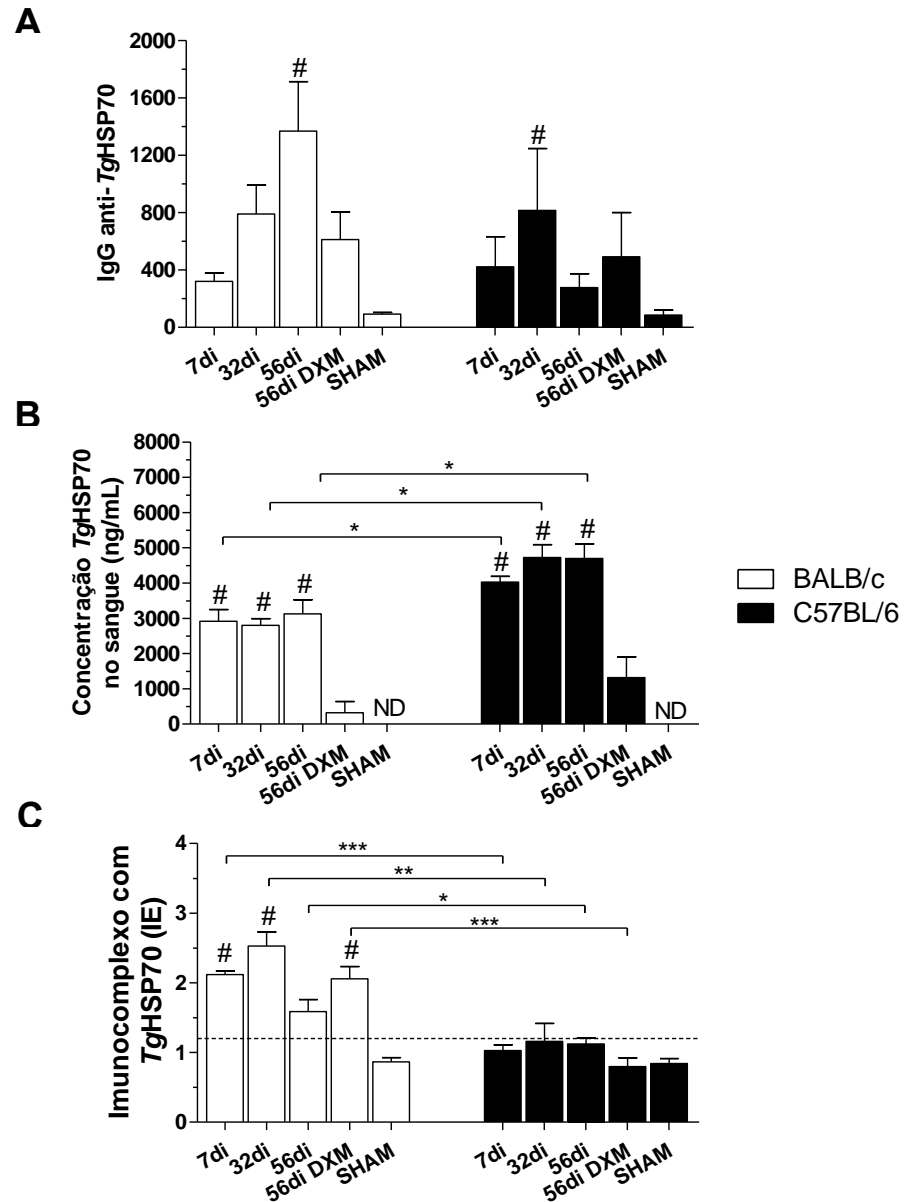
C57BL/6 ( $t=3,126$ ,  $p=0,0353$ ). Em contraste ao resultado obtido para detecção de anticorpos contra STAg, o tratamento com DXM diminuiu a produção de anticorpos anti-*TgHSP70* em ambas as linhagens (Figura 14A).

Os animais infectados de ambas as linhagens, inclusive o grupo com infecção aguda apresentou níveis de *TgHSP70* no soro mais elevados do que os animais não infectados ou do que os animais do grupo *sham* (Figura 14B). O tratamento com DMX diminuiu a detecção de *TgHSP70* no soro dos animais aos 56 dias de infecção (Figura 14B).

Em seguida, foi avaliado se a infecção por *T. gondii* além de estimular a produção de anticorpos anti-*TgHSP70* e aumentar a concentração de *TgHSP70* circulante ainda seria capaz de induzir a formação de CI. Para responder esta questão realizamos ensaio ELISA utilizando IgY anti-*TgHSP70* como anticorpo de captura. Foi observado que camundongos BALB/c apresentam a formação de CI específicos desde 7 dias de infecção (Figura 14C, barras brancas) e camundongos C57BL/6 infectados não desenvolvem a formação de CI (Figura 14C, barras pretas). Estes dados sugerem que a infecção por *T. gondii* estimula a produção de anticorpos anti-*TgHSP70* mais elevados em camundongos BALB/c, liberação de *TgHSP70* na circulação em ambas as linhagens, e subsequentemente a induz a formação de CI em camundongos BALB/c infectados com *T. gondii*.



**Figura 13.** Cinética da produção de anticorpos IgG por *C. callosus* imunizados com *TgHSP70*. *C. callosus* foram imunizados com *TgHSP70* emulsificada em ACF. O soro foi coletado a cada 2 semanas para avaliação por ELISA da produção de anticorpos específicos contra *TgHSP70*.



**Figura 14.** TgHSP70 induz formação de CI em camundongos BALB/c, mas não em C57BL/6. Soros dos animais infectados foram testados para detecção de anticorpos anti-TgHSP70, determinação da quantidade de TgHSP70 circulante e da formação de CI. Camundongos BALB/c tem maior reatividade de anticorpos anti-TgHSP70 aos 56 dias de infecção do que camundongos C57BL/6 no mesmo período (A). Entretanto, a infecção por *T. gondii* estimula aumento na concentração de TgHSP70 circulante no soro de camundongos BALB/c e principalmente em C57BL/6 (B). Porém, BALB/c desenvolvem CI com TgHSP70 enquanto que em camundongos C57BL/6 este efeito não foi observado (C). Valores acima da linha tracejada (*Cutoff* = 1,2) foram considerados positivos. A análise entre os grupo dentro de cada linhagem foi feito pelo teste ANOVA enquanto que a análise entre as linhagens foi feita pelo teste *t* de Student. #, diferença significativa do respectivo grupo em relação ao grupo SHAM. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## 5. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, realizamos a purificação de TgHSP70 de *T. gondii* contida no vetor plasmidial e expresso em *E. coli*. A purificação de proteínas recombinantes em fusão com GST têm sido amplamente explorado na purificação de proteínas recombinantes utilizadas na vacinação (HOBER; UHLÉN, 2005), permite o dobramento da proteína em fusão, levando a solubilização e dificultando a formação de corpos de inclusão (RAY *et al.*, 1993).

A produção de anticorpos derivados do ovo de galinha específicos para diferentes patógenos representa uma evolução no uso de imunoglobulinas para pesquisa e diagnóstico, uma vez que a produção de IgY é mais barata e menos invasiva que a produção de IgG de mamíferos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). Em nosso estudo, o gene da TgHSP70 foi expresso em cultura de *E. coli* para adquirir quantidade de proteína suficiente para imunização de galinhas. A seguir, as galinhas foram imunizadas e os ovos coletados foram submetidos à purificação de IgY. A quantidade de anticorpos purificados por ovo foi consistente com estudos prévios onde mostram que a quantidade de anticorpos presente por gema fica em torno de 30 a 150 mg, dependendo da idade da galinha e do método de extração (PAULY *et al.*, 2009; COOK; TROTT, 2010). Existem vários protocolos de purificação de IgY que podem ser organizados em 3 grupos principais: o de precipitação, cromatografia e ultrafiltração (SCHADE *et al.*, 2005). Entre eles, a delipidização por diluição em água seguida de precipitação com sulfato de amônio ou de sódio é o método mais simples conhecido para se obter grandes quantidade de IgY (AKITA; NAKAI, 1993). A purificação da gema de ovo resultou em amostras contendo IgY com aproximadamente 90 % de pureza, de forma semelhante ao descrito na literatura utilizando os métodos de precipitação com sulfato de sódio 19% e polietilenoglicol 12% (SHIN *et al.*, 2003; PAULY *et al.*, 2009).

A primeira publicação sobre a utilização de anticorpos de galinha para detecção de antígenos de *T. gondii* foi feito por Hassl e colaboradores (1987), no qual eles sugerem que a IgG e a IgY reconhecem diferentes antígenos presentes no lisado de parasitas. Porém, somente recentemente foi mostrado as diversas aplicações da IgY na detecção de taquizoítas e bradizoítas por imunofluorescência bem como a detecção de antígenos de *T. gondii* por ensaios ELISA e *immunoblotting*. Além disso, eles também revelaram que a IgY de galinhas imunizadas reconhecem principalmente proteínas de 40 kDa presentes no STAg, enquanto que a IgG de camundongos reconhecem bandas com peso aproximado de 30 ou 50 kDa. Os

autores ainda mostraram de maneira semelhante aos nossos resultados que anticorpos IgY possuem elevada afinidade independente do tempo de imunização (FERREIRA *et al.*, 2012).

Weiss e colaboradores (1998) identificaram por imunoeletromicroscopia que a TgHSP70 está presente essencialmente no citoplasma de formas bradizoítas da cepa ME-49 de *T. gondii*. Entretanto, as reações de imunofluorescência utilizando anticorpo monoclonal anti-HSP70 (C92F3A-5) não marcaram HSP70 dentro de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Porém, nossos dados de imunofluorescência e *immunoblotting* utilizando IgY policlonal mostraram que parasitas RH possuem TgHSP70 em seu interior. Não obstante, Silva e colaboradores (1998) mostraram aumento da expressão de TgHSP70 *in vivo* utilizando anticorpo policlonal de coelho específica contra a região C-terminal da HSP70 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* quando camundongos são tratados com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  ou anti-TNF $\alpha$ . As diferenças encontradas podem ser explicadas pelo fato de termos utilizado anticorpo policlonal anti-TgHSP70, implicando no reconhecimento de diferentes epítomos da HSP70 (72 kDa) utilizado na imunização, incluindo regiões conservadas da HSC70 (70 kDa) expressa constitutivamente (WEISS *et al.*, 1998). Além disso, aves e mamíferos são animais filogeneticamente distintos, o que faz com que as respectivas imunoglobulinas (IgG e IgY) reconheçam epítomos diferentes (CARLANDER; STALBERG; LARSSON, 1999).

A HSP70 pode apresentar diferentes padrões de localização em diversos protozoários, variando conforme o estágio em que o parasita se encontra. Trofozoítos de *Plasmodium falciparum* contidos dentro de eritrócitos apresentam HSP70 no núcleo e em maior quantidade na periferia do citoplasma onde parece estar associada com a HSP40 para promoção de transporte de outras proteínas através da membrana (PESCE *et al.*, 2008). Além disso, um estudo proteômico de micronemas provinda de oocinetos de *P. berghei* mostrou que parte das proteínas identificadas eram chaperonas, dentre elas a HSP70 (LAL *et al.*, 2009).

Após estresse por choque térmico, os estágios epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e esferomastigotas de *Trypanosoma cruzi* apresentam diferentes padrões de localização intracelular da HSP70, sendo encontrada no núcleo, cinetoplasto, citóstoma, citoplasma, membrana plasmática, membrana flagelar e em vacúolos (GIAMBIAGI-DEMARVAL *et al.*, 1996). Além disso, epimastigotas de *T. cruzi* possuem uma proteína da família das HSP70 presente na mitocôndria que parece ter função de replicação de DNA do cinetoplasto de forma semelhante a HSP70 bacteriana (DnaK) (ENGMAN; KIRCHOFF; DONELSON, 1989).

Nós também investigamos se a TgHSP70 poderia ser secretada por *T. gondii*. Para tanto, mostramos por *immunoblotting* e ELISA que a TgHSP70 não está presente no ESA de

taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. O método de secreção de HSP70 pelas células eucariotas ainda não é totalmente compreendido, embora modelos de células tumorais humanas sugeriram que a HSP70 é liberada por via não-canônica envolvendo endossomos lisossomais (MAMBULA; CALDERWOOD, 2006). Além disso, tanto a HSP70 quanto a HSC70 (forma constitutiva de HSP70) também são secretadas por células de rim de feto de hamster (linhagem BHK-21) por uma via dependente das *lipidrafts* e independente de exossomos (EVDOKIMOVSKAYA *et al.*, 2010). Foi recentemente demonstrado que a HSP70-x é encontrada no citoplasma, em vacúolos parasitóforos e está associada às fendas de Maurer dentro de eritrócitos infectados, sugerindo que esta isoforma da HSP70 pode ser secretada principalmente pela forma esquizonte de *P. falciparum* (GROVER *et al.*, 2013). Análise do antígeno excretado-secretado de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por espectrofotometria de massa identificou que o parasita é capaz de secretar tanto a forma citoplasmática quanto a forma mitocondrial da HSP70. Porém os mecanismos envolvidos na secreção e a função destas chaperonas no meio extracelular ainda não são compreendidos (CUERVO *et al.*, 2009).

Como uma forma proteção do parasita frente à pressão do sistema imune inato, *T. gondii* é capaz de modular vias de transcrição e ativação celular através de proteínas secretadas pelo parasita (HUNTER, SIBLEY, 2012). Sob condições de estresse, alterações genéticas ou morte celular, as células tornam-se capazes de secretar proteínas de choque térmico como mecanismo de alterar ou normalizar as condições em que se encontram, podendo ser estes efeitos de um perfil pró-inflamatórios, anti-inflamatório ou imunomodulador (CALDERWOOD *et al.*, 2007).

Neste trabalho, com o protocolo utilizado foi demonstrado que a imunização de camundongos com TgHSP70 não gera efeito protetor contra a infecção por *T. gondii* e que a TgHSP70 induz elevada quantidade de anticorpos IgG específicas sem a necessidade de adjuvantes. Estudos demonstram que a TgHSP70 é uma molécula importante na produção de anticorpos, ativação de celular e modulação de resposta imune em resposta a infecção de *T. gondii* (YANO *et al.*, 2002), embora a utilização dela ou somente de sua porção C-terminal para a imunização de camundongos utilizando ACF não geram efeito protetor contra a toxoplasmose (MUN *et al.*, 1999; MUN *et al.*, 2000). Mun e colaboradores (1999) demonstraram que a imunização de animais uma única vez com TgHSP70 e adjuvante completo de Freund por 10 dias e posterior desafio com cistos da cepa Fukaya de *T. gondii* não gera proteção contra a infecção. Porém, somente a vacinação utilizando gene TgHSP70 promoveu imunidade protetora e redução da carga parasitária em camundongos C57BL/6, mas não com os genes de BAG1 ou SAG1 (MOHAMED *et al.*, 2003). Também foi verificada

que a vacinação com plasmídeo contendo o gene de *TgHSP70* promove aumento da sobrevivência de animais C57BL/6 e diminuição do escore de reação anafilática de camundongos BALB/c quando estes animais foram infectados e induzidos ao choque anafilático com a proteína *TgHSP70* (KIKUMURA *et al.*, 2010). Makino e colaboradores (2011) mostraram que a vacinação com pDNA codificando o gene de *TgHSP70* é capaz de ativar células dendríticas pela via TLR4/MyD88, estimulando a produção de citocinas do perfil Th1, como IL-12 e IFN- $\gamma$  durante a fase aguda da infecção.

A porção C-terminal da HSP70 apresenta maior antigenicidade do que a porção N-terminal em *T. gondii*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Naegleria fowleri* e *Mycobacterium tuberculosis* (MUN *et al.*, 2000; AMORIM *et al.*, 1996; SONG *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2012). Por causa desta propriedade, a HSP70 de *M. tuberculosis* tem sido utilizada como molécula adjuvante na imunização contra *M. tuberculosis*, contra o vírus da encefalite japonesa (JEV) e contra o vírus influenza A (UTO *et al.*, 2011; GE *et al.*, 2006; EBRAHIMI; TEBIANIAN, 2010).

Camundongos infectados oralmente com a cepa Fukaya (tipo II) estimulam a produção de auto-anticorpos pelas células B-1 contra a HSP70 do hospedeiro, uma vez que a *TgHSP70* e a HSP70 murina possuem elevada identidade conservada (CHEN *et al.*, 2000). Aosai e colaboradores (2002) demonstraram que *TgHSP70* induz proliferação de células B em camundongos deficientes em TLR2 e MyD88, mas não em camundongos TLR4<sup>-/-</sup>, indicando a necessidade do receptor para ativação destas células. Foi observado que camundongos da linhagem suscetível C57BL/6 infectados intraperitonealmente com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* apresentaram uma cinética de título de anticorpos semelhante àquela descrita por Mun e colaboradores (1999) e Chen e colaboradores (2000), no qual camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados oralmente com 10 cistos da cepa Fukaya de *T. gondii* produzem um aumento gradual de anticorpos específicos anti-*TgHSP70* até 4 semanas de infecção e posteriormente há uma redução a níveis não detectáveis após 8 semanas de infecção. Entretanto, camundongos BALB/c resistentes apresentaram um crescimento gradual dos níveis de anticorpos, mas não uma posterior redução após 8 semanas de infecção como na linhagem C57BL/6. Essa diferença provavelmente seja devido à diferença na via de infecção e a cepa e inóculo utilizados.

Não obstante, observou-se também que o estímulo com *TgHSP70* em células do baço de camundongos não imunizados estimula a proliferação destas células enquanto que o estímulo com *TgHSP70* também é responsável por reduzir a proliferação de células do baço do grupo de camundongos imunizados com *TgHSP70* juntamente com ACF, indicando o

papel imunomodulatório desta proteína. Esse fato pode ser explicado da mesma maneira como já descrito para macrófagos, uma vez que a estimulação de macrófagos derivados da medula óssea *in vitro* com TgHSP70 promove ativação das células pela via TLR2-MyD88-IRAK4-TRAF6-IKK e indução da ativação de NF- $\kappa$ B, levando a síntese e liberação de óxido nítrico. Porém, quanto estes macrófagos são reestimulados com TgHSP70, ocorre ativação de TLR4-TRIF levando a expressão de SOCS1 mediada pelo receptor de IFN- $\beta$  e inibição da produção de NO pelos macrófagos (MUN *et al.*, 2005). TgHSP70 também é capaz de estimular a produção de IL-12 por células dendríticas via TLR2 dependente de TRIF, mas não de MyD88 (AOSAI *et al.*, 2006). Deste modo, nossos resultados corroboram com a literatura quanto a ambiguidade da função da TgHSP70, onde por um lado ela é capaz de estimular a proliferação de células do baço e a produção de anticorpos IgG específicos enquanto por outro a TgHSP70 reduz a proliferação desta células quando reestimuladas e não protege contra a infecção utilizando este protocolo.

Camundongos Swiss-Webster infectados oralmente com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* têm aumento progressivo da carga parasitária no cérebro durante o tempo da infecção atingindo um platô após os 21 dias de infecção. A carga parasitária no fígado, no pulmão e no sangue ocorre principalmente durante a fase aguda da doença, reduzindo após 14 dias de infecção (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ *et al.*, 2012). Observamos também que a quantidade de parasitas no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados por 32 e 56 dias foi bastante similar enquanto que os camundongos BALB/c tiveram ainda aumento na carga parasitária.

Em nosso estudo, tratamos os animais com DXM, um imunossupressor capaz de reativar a infecção por *T. gondii* (NICOLL *et al.*, 1997). Nossos resultados mostraram que mesmo com a imunossupressão dos animais com DXM, camundongos BALB/c conseguem controlar a infecção por *T. gondii*, não apresentando alta carga parasitária como ocorre nos animais C57BL/6. Além disso, camundongos infectados e tratados com DXM não diminuem a reatividade dos anticorpos contra STAg, embora ocorra a redução da produção de anticorpos específicos contra TgHSP70. Um estudo anterior mostrou que camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com 20 taquizoítas da cepa transgênica PLK/GFP (a qual expressa constitutivamente a proteína fluorescente verde) de *T. gondii* (tipo II) apresentam baixa carga parasitária no cérebro após 3 semanas de tratamento com DXM durante a fase crônica (TAKASHIMA *et al.*, 2008). Porém, camundongos BALB/c infectados oralmente com 25 cistos da cepa 76KT. *gondii* (tipo II) e tratados com DXM durante a fase crônica da infecção tem diminuição na sobrevivência após uma semana de tratamento, redução

transitória da quantidade de células T CD4<sup>+</sup>, de anticorpos IgG total e IgG2a específicos contra *T. gondii* e aumento da carga parasitária no cérebro (KANG *et al.*, 2006). Provavelmente, tal diferença seja devido às metodologias utilizadas na infecção por *T. gondii*, uma vez que a cepa, a via de infecção e a carga parasitária influenciam na resposta imune do hospedeiro contra o parasita (REICHARD; GROSS, 2007).

A imunossupressão utilizando anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* mostrou que as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são fundamentais na resistência contra a infecção e que juntas desempenham um papel complementar na produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  como uma alternativa de prevenção da reativação por *T. gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Camundongos BALB/c previamente infectados com a cepa ME-49 e tratados com ciclofosfamida (um imunossupressor) são novamente infectados com outra cepa recombinante de *T. gondii* (CH3 ou EGS), ocorre aumento no número de cistos presentes no cérebro bem como aumento da mortalidade no grupo (SILVA *et al.*, 2012). Tanto os alelos H-2<sup>b</sup>/H-2<sup>d</sup> do MHC quanto o background genético influenciam na proteção e sobrevivência de camundongos quando estes são infectados com *T. gondii* (WILLIAMS *et al.*, 1978), afetando o número de cistos cerebrais (FUX *et al.*, 2003; RESENDE *et al.*, 2008). Durante a infecção por *T. gondii*, proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol, a profilina, a ciclofilina 18 e a TgHSP70, que têm importantes efeitos imunológicos (POLLARD; KNOLL; MORDUE, 2009). Juntamente com as outras moléculas supracitadas, a TgHSP70 promove a produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-12, as quais são responsáveis por construir uma resposta mediada por células NK e T CD8<sup>+</sup>, favorecendo uma resposta Th1 ao invés de Th2 (LEWIS; WILSON, 2005).

Em nosso trabalho, mostramos que o tratamento com DXM foi capaz de reduzir a inflamação no cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados intraperitonealmente com 10 cistos da cepa ME-49 (tipo II) de *T. gondii*. Nossos dados estão de acordo com um estudo anterior que mostrou que camundongos da linhagem Porton infectados por via intraperitoneal com 30 cistos do isolado M3 (tipo II) de *T. gondii* e tratados com DXM desenvolvem menos alterações histológicas como necrose, gliose e inflamação linfóide no cérebro do que aqueles camundongos que não foram tratados (NICOLL *et al.*, 1997).

Foi demonstrado por qPCR que camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com *T. gondii* tem aumento na expressão de TgHSP70 no cérebro, mesmo durante o tratamento com DXM. Isso sugere que nestes animais ocorre maior diferenciação (WEISS *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1998) entre estágios do que nos camundongos BALB/c talvez por maior



pressão do sistema imune evidenciado pelo maior número de infiltrados inflamatórios nestes animais.

Foram realizados ensaios ELISA sanduíche para detecção de TgHSP70 no soro de camundongos infectados com *T. gondii*. Partindo do princípio que camundongos compartilham semelhanças na estrutura do anticorpo de *C. callosus* (FAVORETO-JÚNIOR *et al.*, 1998), utilizamos IgG de *C. callosus* como anticorpo de captura do antígeno no sangue de camundongos experimentais, e IgY como anticorpo de detecção. Ensaios ELISA sanduíche utilizando IgY também foram utilizados para detecção de HSP70 de *Mycobacterium avium* circulante no soro bovino (BRUJENI; GHARIBI, 2012). Outro trabalho também mostra a utilização de IgY como integrante de ensaio de ELISA sanduíche para detecção de antígeno solúvel de ovos de *Schistosoma japonicum* circulante no soro de pacientes (CAI *et al.*, 2012). Além disso, a imunização de galinhas com extrato antigênico de *Helicobacter pylori* induz a produção de IgY capaz de reconhecer 5 proteínas imunodominantes, dentre elas a proteína de choque térmico HSP60, descrita com um alvo importante para desenvolvimento de tratamento e vacinas em humanos (SHIN *et al.*, 2003).

Uma vez fora das células, a HSP70 parece desempenhar um papel de comunicação entre as células para início da resposta imune contra moléculas citoplasmáticas (JOLESCH *et al.*, 2012). Basicamente a HSP70 pode ser liberada por dois meios: (1) secreção ou (2) extravasamento do conteúdo citoplasmático após necrose. Assim, a HSP70 é capaz de adentrar a circulação e se ligar a receptores celulares como TLRs, CD91, CD40 e CCR5 que podem funcionar sinergicamente ou antagonicamente na ativação ou regulação da resposta imune (CALDERWOOD *et al.*, 2007). Os dados apresentados demonstram que a TgHSP70 não é secretada por taquizoítas de *T. gondii*, sugerindo que esta proteína possa ser liberada durante o rompimento de cistos e morte de parasitas expostos ao sistema imune.

CI solúveis são capazes de estimular macrófagos de três subtipos distintos (M1, M2a e M2c) a produzirem IL-10, resultando na regulação do sistema imune como um *feedback* fisiológico, contribuindo para redução da resposta imune inflamatória nos tecidos enquanto o sistema adaptativo se encarrega de eliminar os microrganismos (AMBARUS *et al.*, 2011). Além disso, a indução da produção de IL-10 pela fração de monócitos induzida por CI levam a formação de mais anticorpos pelas células, as quais entram em um ciclo vicioso na formação de mais CI associados com a patologia na doença do lúpus eritematoso sistêmico (RÖNNELID *et al.*, 2003). Quando macrófagos infectados com *T. gondii* são estimulados após 18 horas com LPS e complexo imune apresentaram inibição da fosforilação da histona H3, que promove acetilação no promotor do gene *il10*, estimulando a produção exagerada de

IL-10 como um mecanismo de regulação negativa da resposta celular contra o parasita (LENG; DENKERS, 2009). Ademais, a *TgHSP70* também foi demonstrada como sendo capaz de estimular reação anafilática mediada pela via TLR4 dependente de MyD88, ativando MAPK quinases e fosfolipase A<sub>2</sub> circulante e estimulando a formação de fator ativador de plaquetas (PAF) e levando camundongos a morte (FANG *et al.*, 2008).

A formação de CI depende tanto da concentração de antígeno solúvel disponível quanto dos níveis de anticorpos. A quantidade de formação de precipitado é maior quanto a proporção antígeno-anticorpos está contida dentro da zona de equivalência (aproximadamente 1:1) e reduz caso haja o excesso de antígeno ou de anticorpo (CRUSE; LEWIS, 2010). A detecção de antígeno p30, anticorpos IgG anti-p30 e CI com p30 no fluido cefalorraquidiano de pacientes soropositivos para o vírus HIV podem ser utilizados como marcadores para a encefalite toxoplásmica (CHAVES-BORGES *et al.*, 1999). Foi demonstrado que camundongos BALB/c infectados apresentaram tanto menor expressão de *TgHSP70* no cérebro quanto na concentração de *TgHSP70* no soro do que camundongos C57BL/6. Além disso, o fato dos animais BALB/c infectados por 56 dias terem apresentado menor concentração de CI deve estar associado a maior quantidade de anticorpos disponíveis na circulação. Não obstante, não foi detectado níveis significativos de CI para *TgHSP70* em camundongos C57BL/6, indicando que a elevada concentração de *TgHSP70* e os menores níveis de anticorpos disponíveis no sangue não favorecem a formação de CI nesta linhagem. Juntos, os dados apresentados sugerem que a detecção de anticorpos anti-*TgHSP70*, de *TgHSP70* e de CI anti-*TgHSP70* no soro podem ser utilizados como marcadores da infecção por *T. gondii*.

Por fim, os dados obtidos sugerem que a HSP70 recombinante de *T. gondii* pode ser utilizada como um estímulo policlonal, “adjuvante” em protocolos de imunização, além disso, a proteína pode ser utilizada como ferramenta alternativa no diagnóstico da toxoplasmose.

## 6. CONCLUSÕES

- Expressamos em *E. coli* e purificamos TgHSP70 recombinante com alto nível de pureza para utilização nos ensaios de diagnóstico e imunização.
- Obtivemos altos níveis de pureza de IgY específica e de elevada afinidade anti-TgHSP70.
- TgHSP70 é uma proteína citoplasmática que parece estar associada com a face interna da membrana plasmática de taquizoítas e não é secretada por *T. gondii*.
- TgHSP70 é capaz de estimular a produção de anticorpos independente de ACF
- TgHSP70 estimula a proliferação de células do baço de camundongos não imunizados e modula a proliferação dessas células de camundongos imunizados com TgHSP70 após reestímulo.
- De acordo com nosso modelo experimental, somente células do baço provenientes de camundongos imunizados com ACF estimuladas *in vitro* apresentaram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  e IL-10.
- Tratamento com DXM aumenta a carga parasitária em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados, mas não em BALB/c e reduz as alterações histológicas no cérebro em ambas as linhagens, embora a patologia nos animais suscetíveis seja sempre maior.
- Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados possuem maior expressão de TgHSP70 no cérebro do que BALB/c, mesmo durante o tratamento com DXM.
- A infecção por *T. gondii* estimula a produção de anticorpos anti-TgHSP70, liberação de TgHSP70 na corrente sanguínea em ambas as linhagens e formação de CI em camundongos BALB/c.

## REFERÊNCIAS\*

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, p. 207-214, 1993.

ALIBERTI J.; VALENZUELA J. G.; CARRUTHERS V. B.; HIENY S.; ANDERSEN J.; CHAREST H.; REIS E SOUSA C.; FAIRLAMB A.; RIBEIRO J. M.; SHER A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 485-490, 2003.

AMBARUS, C. A.; SANTEGOETS, K. C.; VAN BOM, L.; WENINK, M. H.; TAK, P. P.; RADSTAKE, T. R.; BAETEN, D. L. Soluble immune complexes shift the TLR-induced cytokine production of distinct polarized human macrophage subsets towards IL-10. **PLoS One**, v. 7, p. e35994, 2012.

AMORIM, A. G.; CARRINGTON, M.; MILES, M. A.; BARKER, D. C.; DE ALMEIDA, M. L. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. **Cell Stress and Chaperones**, v. 1, p.177-187, 1996.

AOSAI, F.; CHEN, M.; KANG, H. K.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; PIAO, L. X.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; YANO, A. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein HSP70 functions as a B cell mitogen. **Cell Stress Chaperones**, v. 7, p. 357-364, 2002.

AOSAI, F.; RODRIGUEZ PENA, M. S.; MUN, H. S.; FANG, H.; MITSUNAGA, T.; NOROSE, K.; KANG, H. K.; BAE, Y. S.; YANO, A. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. **Cell Stress and Chaperones**, v. 11, p. 13-22, 2006.

ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J. A.; BARE, O.; AURON, P. E.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15028-15034, 2002.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; PENA, J. D.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependente on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, p. 624-630, 2007.

BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; FERRO, E. A.; NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 44-52, 2012.

---

\*Segundo a Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT)

BARRAGAN A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma* across biological barriers. **Trends in microbiology**, v. 11, p. 426-430, 2003.

BARTLEY P. M.; WRIGHT S.; SALES J.; CHIANINI F.; BUXTON D.; INNES E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v. 133, p. 421-432, 2006.

BRUJENI, G. N.; GHARIBI, D. Development of DNA-designed avian IgY antibodies for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal cattle. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 14-23, 2012.

CAI, Y. C.; GUO, J.; CHEN, S. H.; TIAN, L. G.; STEINMANN, P.; CHEN, M. X.; LI, H.; AI, L.; CHEN, J. X. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v. 61, p. 385-390, 2012.

CALDERWOOD, S. K.; MAMBULA, S. S.; GRAY, P. J. Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1113, p. 28-39, 2007.

CARLANDER, D.; STÅLBERG, J.; LARSSON, A. Chicken Antibodies - A Clinical Chemistry Perspective. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 104, p. 179-190, 1999.

CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. **Cellular Microbiology**, v. 1, p. 225-235, 1999.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion Microbiology**, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 15, p. 1265-1271, 2008.

CÉRÈDE, O.; DUBREMETZ, J. F.; SOËTE, M.; DESLÉE, D.; VIAL, H.; BOUT, D.; LEBRUN, M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 453-463, 2005.

CHANNON J. Y.; SEGUIN R. M.; KASPER L. H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4822-4826, 2000.

CHAVES-BORGES, F. A.; SOUZA, M. A.; SILVA, D. A.; KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii* soluble antigen, SAG-1(p30), antibody and immune complex in the cerebrospinal fluid of HIV positive or negative individuals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 329-338, 1999.

CHEN, M.; AOSAI, F.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; HATA, H.; YANO, A. Anti-HSP70 autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4893-4899, 2000.

COOK, M. E.; TROTT, D. L. IgY - Immune component of eggs as a source of passive immunity for animals and humans. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 66, p. 215-226, 2010.

CRUSE, J. C.; LEWIS, R. E. **Atlas of Immunology**. 3<sup>a</sup> ed. New York: CRC Press, 2010. 940 p.

CUERVO, P.; DE JESUS, J. B.; SABOIA-VAHIA, L.; MENDONÇA-LIMA, L.; DOMONT, G. B.; CUPOLILLO, E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 79-92, 2009.

DECKERT-SCHLÜTER M.; SCHLÜTER D.; THEISEN F.; WIESTLER O. D.; HOF H. Activation of the innate immune system in murine congenital *Toxoplasma* encephalitis. **The Journal of Neuroimmunology**, v. 53, p. 47-51, 1994.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 135, p. 173-180, 2010.

DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; DJOKIĆ, V.; VUJANIĆ, M.; ZIVKOVIĆ, T.; BOBIĆ, B.; NIKOLIĆ, A.; SLAVIĆ, K.; KLUN, I.; IVOVIĆ, V. Kinetics of parasite burdens in blood and tissues during murine toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 372-376, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton, CRC Press, 2010, 318 p.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375-1424, 2012.

EBRAHIMI, S. M.; TEBIANIAN, M. Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to *Mycobacterium tuberculosis* HSP70(359-610) in prokaryotic system as a fusion protein. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 2877-2883, 2010.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. C.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 1471-4922, 2010.

ENGMAN, D. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Molecular cloning of mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. **Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 5163-5168, 1989.

EVDOKIMOVSKAYA, Y.; SKARGA, Y.; VRUBLEVSKAYA, V.; MORENKOV, O. Secretion of the heat shock proteins HSP70 and HSC70 by baby hamster kidney (BHK-21) cells. **Cell Biology International**, v. 34, p. 985-990, 2010.

FANG, H.; MUN, H. S.; KIKUMURA, A.; SAYAMA, Y.; NOROSE, K.; YANO, A.; AOSAI, F.. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 induces lethal anaphylactic reaction through activation of cytosolic phospholipase A2 and platelet-activating factor via Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88. **Microbiology Immunology**, v. 52, p. 366-374, 2008.

FAVORETO-JÚNIOR, S.; FERRO, E. A.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 103-107, 1998.

FERREIRA JÚNIOR, Á.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACÊDO JÚNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, p. e40391, 2012.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 443-457, 2002.

FU, F.; TIAN, H.; LI, X.; LANG, Y.; TONG, G.; LIU, S.; LI, H.; WANG, W.; LI, X.; CHEN, X. C-terminal heat shock protein 70 of *Mycobacterium tuberculosis* as a molecular adjuvant for DNA vaccination with the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice. **Veterinary Journal**, [Epub ahead of print], 2012.

FURUTA, T.; KIKUCHI, T.; AKIRA, S.; WATANABE, N.; YOSHIKAWA, Y. Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. **International Immunology**, v. 18, p. 1655-1662, 2006.

FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, R. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, D.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6392-6401, 2003.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; 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**, v. 146, p. 286-292, 1991.

GAZZINELLI, R.; YUHUI, X.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 149, p. 175-180, 1992.

GAZZINELLI, R. T.; AMICHAY, D.; SHARTON-KERSTEN, T.; GRUNWALD, E.; FARBER J. M.; SHER A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 219, p. 127-139, 1996.

GE, F. F.; QIU, Y. F.; GAO, X. F.; YANG, Y. W.; CHEN, P. Y. Fusion expression of major antigenic segment of JEV E protein-hsp70 and the identification of domain acting as adjuvant in hsp70. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 288-296, 2006.

GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SOUTO-PADRÓN, T.; RONDINELLI, E. Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 83, p. 335-345, 1996.

GROVER, M.; CHAUBEY, S.; RANADE, S.; TATU, U. Identification of an exported heat shock protein 70 in *Plasmodium falciparum*. **Parasite**, v. 20, p. 1-9, 2013.

HÅKANSSON, S.; MORISAKI, H.; HEUSER, J.; SIBLEY, L. D. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 3539-3547, 1999.

HAQUE, S.; HANNA, S.; GHARBI, S.; FRANCK, J.; DUMON, H.; HAQUE, A. Infection of mice by a *Toxoplasma gondii* isolate from an AIDS patient: virulence and activation of hosts' immune responses are independent of parasite genotype. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 649-657, 1999.



HASSL A, ASPÖCK H, FLAMM H. Comparative studies on the purity and specificity of yolk immunoglobulin Y isolated from eggs laid by hens immunized with *Toxoplasma gondii* antigen. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v. 267, p. 247-53, 1987.

HE, Y.; BJORKMAN, P. J. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 108, p. 12431-12436, 2011.

HOBER, S.; UHLÉN, M. Enhanced recovery and folding of recombinant proteins using fusion protein strategies. In: ALBERGHINA (ed). **Protein engineering in industrial biotechnology**. Amsterdam, Taylor & Francis, 2005. p. 22-38.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 766-778, 2012.

HUYNH, M. H.; RABENAU, K. E.; HARPER, J. M.; BEATTY, W. L.; SIBLEY L. D.; CARRUTHERS, V. B. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. **EMBO Journal**, v. 22, p. 2082-2090, 2003.

HWANG, I. Y.; QUAN, J. H.; AHN, M. H.; AHMED, H.; CHA, G. H.; SHIN, D. W.; LEE, Y. H. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1313-1321, 2010.

JOLESCH, A.; ELMER, K.; BENDZ, H.; ISSELS, R. D.; NOESSNER, E. Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. **European Journal of Cell Biology**, v. 2012, v. 91, p. 48-52, 2012.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10-25, 2010.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 579-592, 2010.

KANG, K.; CHOI, I.; SHIN, D.; LEE Y. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. **Korean Journal of Parasitology**, v. 44, p. 209-219, 2006.

KATO, Y.; KAJIWARA, C.; ISHIGE, I.; MIZUKAMI, S.; YAMAZAKI, C.; EIKAWA, S.; KAKIMI, K.; UDONO, H. HSP70 and HSP90 Differentially Regulate Translocation of Extracellular Antigen to the Cytosol for Cross-Presentation. **Autoimmune Diseases**, v. 2012, p. 745962, 2012.

KELLY M. N.; KOLLS J. K.; HAPPEL K.; SCHWARTZMAN J. D.; SCHWARZENBERGER P.; COMBE C.; MORETTO M.; KHAN I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 617-621, 2005.

KHAN I. A.; SCHWARTZMAN J. D.; MATSUURA T.; KASPER L. H. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, p. 13955-13960, 1997.

KHAN I. A.; SMITH K. A.; KASPER L. H. Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 141, p. 3600-3605, 1998.

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal of Parasitology**, v. 41, p. 645-655, 2011.

KIKUMURA, A.; FANG, H.; MUN, H. S.; UEMURA, N.; MAKINO, M.; SAYAMA, Y.; NOROSE, K.; AOSAI, F. Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in *Toxoplasma gondii*-infected mice by DNA vaccination with T. *gondii*-derived heat shock protein 70 gene. **Parasitology international**, v. 59, p. 105-111, 2010.

LACHENMAIER, S. M.; DELI, M. A.; MEISSNER, M.; LIESENFELD, O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, p. 119-130, 2010.

LAL, K.; PRIETO, J. H.; BROMLEY, E.; SANDERSON, S. J.; YATES, J. R. 3RD.; WASTLING, J. M.; TOMLEY, F. M.; SINDEN, R. E. Characterisation of *Plasmodium* invasive organelles; an ookinete microneme proteome. **Proteomics**, v. , p. 1142-1151, 2009.

LARSSON, A.; BÅLÖW, R. M.; LINDAHL, T. L.; FORSBERG, P. O. Chicken antibodies: taking advantage of evolution - a review. **Poultry Science**, v. 72, p. 1807-1812, 1993.

LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJÖQUIST, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 411-414, 1991.

LARSSON, A.; WEJÅKER, P. E.; FORSBERG, P. O.; LINDAHL, T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 156, p. 79-83, 1992.

LENG J, DENKERS EY. *Toxoplasma gondii* inhibits covalent modification of histone H3 at the IL-10 promoter in infected macrophages. **PLoS One**, v. 4, p. e7589, 2009.

LEWIS, D. B; WILSON, C. B. Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infections. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J.; BABER, C.; WILSON, C. B. (eds.). **Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant**. Philadelphia PA: Elsevier Saunders, 2005. p. 88-210.

LIESENFELD, O.; KOSEK J.; REMINGTON J. S.; SUZUKI Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 597-607, 1996.

LIESENFELD, O.; KANG H.; PARK D.; NGUYEN T. A.; PARKHE C. V.; WATANABE H.; ABO T.; SHER A.; REMINGTON J. S.; SUZUKI Y. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 365-376, 1999.

LIU R. Y.; LI X.; LI L.; LI G. C. Expression of human hsp70 in rat fibroblasts enhances cell survival and facilitates recovery from translational and transcriptional inhibition following heat shock. **Cancer Research**, v. 52, p. 3667-3673, 1992.

LIU, T.; DANIELS, C. K.; CAO, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. **Pharmacology Therapy**, v. 136, p. 354-374, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOURENÇO, E. V.; PEREIRA, S. R.; FAÇA, V. M.; COELHO-CASTELO, A. A.; MINEO, J. R.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GREENE, L. J.; PANUNTO-CASTELO, A. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology*, v. 11, p. 541-547, 2001.

MA, G. Y.; ZHANG, J. Z.; YIN, G. R.; ZHANG, J. H.; MENG, X. L.; ZHAO, F. *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 41-46, 2009.

MAKINO, M.; UEMURA, N.; MORODA, M.; KIKUMURA, A.; PIAO, L. X.; MOHAMED, R. M.; AOSAI, F. Innate immunity in DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene that induces DC activation and Th1 polarization. **Vaccine**, v. 29, p. 1899-1905, 2011.

MAMBULA, S. S.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 7849-7857, 2006.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 670-684, 2005.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 11-20, 1994.

MOHAMED, R. M.; AOSAI, F.; CHEN, M.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; BELAL, U. S.; PIAO, L. X.; YANO, A. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. **Vaccine**, v. 21, p. 2852-2861, 2003.

MUN, H. S.; AOSAI, F.; YANO, A. Role of *Toxoplasma gondii* HSP70 and *Toxoplasma gondii* HSP30/bag1 in antibody formation and prophylactic immunity in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Immunology**, v. 43, p. 471-479, 1999.

MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; HATA, H.; TAGAWA, Y. I.; IWAKURA, Y.; BYUN, D. S.; YANO, A. *Toxoplasma gondii* Hsp70 as a danger signal in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Cell Stress and Chaperones**, v.5: 328-335, 2000.

MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; PIAO, L. X.; FANG, H.; AKIRA, S.; YANO, A. Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. **Infection and Immunology**, v. 73, p. 4634-4642, 2005.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunology Reviews**, v. 240, p. 269-285, 2011.

NICOLL, S.; WRIGHT, S.; MALEY, S. W.; BURNS, S.; BUXTON, D. A mouse model of recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, p. 263-266, 1997.

OLIVEIRA M. A.; SANTIAGO H. C.; LISBOA C. R.; CERAVOLLO I. P.; TRINCHIERI G.; GAZZINELLI R. T.; VIEIRA L. Q. *Leishmania* sp.: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 96-105, 2000.

PAULY, D.; DORNER, M.; ZHANG, X.; HLINAK, A.; DORNER, B.; SCHADE, R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, v. 88, p. 281-290, 2008.

PESCE, E. R.; ACHARYA, P.; TATU, U.; NICOLL, W. S.; SHONHAI, A.; HOPPE, H. C.; BLATCH, G. L. The *Plasmodium falciparum* heat shock protein 40, Pfj4, associates with heat shock protein 70 and shows similar heat induction and localisation patterns. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, p. 2914-2926, 2008.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 388-393, 2011.

POLLARD, A. M.; KNOLL, L. J.; MORDUE, D. G. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 491-494, 2009.

RACHINEL, N.; BUZONI-GATEL, D.; DUTTA, C.; MENNECHET, F. J.; LUANGSAY, S.; MINNS, L. A.; GRIGG, M. E.; TOMAVO, S.; BOOTHROYD, J. C.; KASPER, L. H. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 2725-2735, 2004.

RAY, M. V.; VAN DUYNE, P.; BERTELSEN, A. H.; JACKSON-MATTHEWS, D. E.; STURMER, A. M.; MERKLER, D. J.; CONSALVO, A. P.; YOUNG, S. D.; GILLIGAN, J. P.; SHIELDS, P. P. Production of recombinant salmon calcitonin by *in vitro* amidation of an *Escherichia coli* produced precursor peptide. **Biotechnology**, v. 11, p. 64-70, 1993.

REICHARD, U.; GROSS, U. *Toxoplasma* animal models and therapeutics. In: WEISS, L. M.; KIM, K. (eds.). ***Toxoplasma gondii: the model Apicomplexan: perspectives and methods***. London: Elsevier, 2007. p. 153-177.

RESENDE, M. G.; FUX, B.; CAETANO, B. C.; MENDES, E. A.; SILVA, N. M.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T. The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 85-99, 2008.

RIBEIRO, D. P.; FREITAS, M. M.; CARDOSO, M. R.; PAJUABA, A. C.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; SILVA, J. S.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. CpG-ODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, v. 27, p. 2570-2579, 2009.

ROBERTS, C. W.; BREWER, J. M.; ALEXANDER, J. Congenital toxoplasmosis in the BALB/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. **Vaccine**, v. 12, p. 1389-1394, 1994.

RÖNNELID, J.; TEJDE, A.; MATHSSON, L.; NILSSON-EKDAHL, K.; NILSSON, B. Immune complexes from SLE sera induce IL10 production from normal peripheral blood mononuclear cells by an Fc $\gamma$ RII dependent mechanism: implications for a possible vicious cycle maintaining B cell hyperactivity in SLE. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. 37-42, 2003.

SAWMYNADEN, K.; SAOUROS, S.; FRIEDRICH, N.; MARCHANT, J.; SIMPSON, P.; BLEIJLEVENS, B.; BLACKMAN, M. J.; SOLDATI-FAVRE, D.; MATTHEWS, S. Structural insights into microneme protein assembly reveal a new mode of EGF domain recognition. **EMBO Reports**, v. 9, p. 1149-1155, 2008.

SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; VAN REGENMORTEL, M.; RIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. **ATLA**, v. 24, p. 925-934, 1996.

SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative Laboratory Animals**, v. 33, p. 129-154, 2005.

SHEINER, L.; SANTOS, J. M.; KLAGES, N.; PARUSSINI, F.; JEMMELY, N.; FRIEDRICH, N.; WARD, G. E.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. **Molecular Microbiology**, v. 77, p. 912-929, 2010.

SHIN, J. H.; NAM, S. W.; KIM, J. T.; YOON, J. B.; BANG, W. G.; ROE, I. H. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 217-222, 2003.

SILVA, N. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, D. A.; FERRO, E. A.; KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during in vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites. **Infection and immunity**, v. 66, p. 3959-3963, 1998.

SILVA, D. A.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 234-244, 2007.

SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 167-77, 2010.

SILVA, L. A.; BRANDÃO, G. P.; PINHEIRO, B. V.; VITOR, R. W. Immunosuppression with cyclophosphamide favors reinfection with recombinant *Toxoplasma gondii* strains. **Parasite**, v. 19, p. 249-257, 2012.

SONG, K. J.; SONG, K. H.; NA, B. K.; KIM, J. H.; KWON, D.; PARK, S.; PAK, J. H.; IM, K. I.; SHIN, H. J. Molecular cloning and characterization of a cytosolic heat shock protein 70 from *Naegleria fowleri*. **Parasitology Research**, v. 100, p. 1083-1089, 2007.

SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; DU PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, p. 313-322, 2012.

STÅLBERG, J.; LARSSON, A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 106, p. 99-110, 2001.

STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M. E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A. H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology**, v. 217, p. 28-36, 2012.

SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. **The Journal of Immunology**, v. 147, p. 3955-3959, 1991.

TAKASHIMA, Y.; SUZUKI, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.; UNNO, A.; KITO, K. Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii* reactivation in brain tissue. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 601-607, 2008.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

UTO, T.; TSUJIMURA, K.; UCHIJIMA, M.; SETO, S.; NAGATA, T.; SUDA, T.; CHIDA, K.; NAKAMURA, H.; KOIDE, Y. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 61, p. 189-196, 2011.

WEISS, L.M.; MA, Y. F.; TAKVORIAN, P. M.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. **Infection and immunity**, v. 66, p.3295-3302, 1998.

YANO, A.; MUN, H. S.; CHEN, M.; NOROSE, K.; HATA, K.; KOBAYASHI, M.; AOSAI, F.; IWAKURA, Y. Roles of IFN- $\gamma$  on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. **International Review Immunology**, v. 21, p. 405-421, 2002.



**ANEXO I**

Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131/4335; e-mail: ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 060/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O  
PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 008/09**

Projeto Pesquisa: “ Papel da proteína HPS70 de *T. gondii* no diagnóstico da Toxoplasmose ativa”.

Pesquisador Responsável: Neide Maria da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 14 de julho de 2009.

Prof. Dr. José Roberto Mineo  
Coordenadora do CEUA/UFU  
*pro - tempore*