

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**Avaliação da resposta imune de camundongos C57BL/6 imunizados  
com antígeno solúvel ou com as proteínas recombinantes SAG2A e  
BSR4 de *Toxoplasma gondii* formuladas em lipossomos**

**LETÍCIA DELFINI VAZ**

**Uberlândia - MG**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**Avaliação da resposta imune de camundongos C57BL/6 imunizados  
com antígeno solúvel ou com as proteínas recombinantes SAG2A e  
BSR4 de *Toxoplasma gondii* formuladas em lipossomos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

**LETÍCIA DELFINI VAZ**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JAIR PEREIRA DA CUNHA JÚNIOR**

**Uberlândia - MG**

**2014**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



**Letícia Delfini Vaz**

“Avaliação da resposta imune de camundongos C57BL6 imunizados com antígeno solúvel ou com as proteínas recombinantes SAG2A e BSR 4 de *Toxoplasma gondii* formuladas em lipossomos”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 18 de junho de 2014.

Profa. Dra. Rosângela Maria Rodrigues – UFG/JATAÍ

Profa. Dra. Fernanda Maria Santiago – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior (orientador) – ICBIM/UFU

## **DEDICATÓRIA**

Dedico mais esta vitória a Deus

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe Thelma pelo amor incondicional e grande exemplo de esforço e bondade e a meu pai Ronaldo por me ensinar a importância do estudo e sempre acreditar em mim. Agradeço pelo incentivo e apoio em mais esta etapa de minha vida, vida esta que devo a vocês!

A minha irmã Carol por quem eu verdadeiramente daria minha vida.

A minha tia Dodora, por ser a pessoa mais especial que eu conheço. Seus ensinamentos fazem parte de mim, seu bom humor e bondade são o que mais almejo.

A meu tio Crésio pelo exemplo de superação e dedicação ao trabalho. Minha mais profunda gratidão por toda ajuda que sempre prestou a minha família.

A meu tio e padrinho Renê pelo empreendedorismo nato.

A meu tio Zé por sempre se preocupar com minha formação.

A meus queridos tio Dodô e tia Dalva.

A toda minha família por parte de mãe, em especial a minha avó materna pelo suporte aqui em Uberlândia.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. José Roberto Mineo que iniciou esta trajetória de pesquisa antigênica de *Toxoplasma gondii*, e assim propiciou o desenvolvimento científico de inúmeros trabalhos, incluindo este.

A meu orientador Jair Pereira da Cunha Júnior principalmente pelo ensinamento, mas também pela paciência, solidariedade e generosidade.

Ao Silas Silva Santana meu eterno coorientador de suma importância na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani por ceder gentilmente as proteínas utilizadas nesta pesquisa, sem ele este trabalho não poderia ser realizado.

Aos Professores Doutores: Tiago Wilson P. Mineo, Marcelo José Barbosa Silva, Fernanda Maria Santiago e Marcelo Emílio Beletti pelos conselhos científicos apoio técnico e disponibilidade de espaço.

À Prof. Dra. Neide Maria da Silva que além de auxiliar nesta pesquisa como um todo, abrillantou o trabalho com suas ideias e com as técnicas histológicas.

As Prof. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva e Prof. Dra. Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba pelo suporte científico e disponibilidade em ajudar sempre.

A todos os colegas, alunos e funcionários do laboratório de Imunoparasitologia: Edilge, Dona Zilda, Marley, Max, Cris, Fernando, Arlindo, Caroline, Murilo, Flavinha, Black, Eliézer.

À Bianca pelo ajuda imprescindível e generosidade.

Aos meus companheiros de bancada: Lucas e Gabriela.

Aos amigos do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica: Isa, Bia, Ju, Leandro, Paula, Jade.

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi que me acolheu gentilmente em seu laboratório, pelo auxílio científico e generosidade.

A república UAI MEU, pelos momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos Larica, Erva que sempre estarão no meu coração.

A meus amigos e companheiros Fernanda, Marco Túlio, Poliana e Mister, que por me amarem tanto prorrogaram seu período na Universidade.

A minha melhor amiga Fernanda por estar sempre ao meu lado desde o cursinho até os dias de hoje. Sem você meu caminho seria muito mais difícil.

A minhas primas/irmãs Igara e Mará que fazem tudo por mim! Espero um dia retribuir tamanho amor.

A minha Prima Ana Paula a quem tento sempre me espelhar.

A minhas melhores amigas de São Joaquim da Barra: Maria Fernanda, Mariana Bezerra, Flávia, Paty, Aline, Tia Sandra.

Ao meu namorado Lucas que me fez feliz novamente.

## Resumo

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular que provoca a toxoplasmose e é amplamente prevalente nos seres humanos e outros animais. Neste estudo foi investigada a imunogenicidade e efeito protetor do antígeno solúvel de *T. gondii* - STAg, bem como das proteínas recombinantes SAG2A e BSR4. As proteínas em combinação com lipossomos foram administradas via intraperitoneal em camundongos C57BL/6 e os níveis de anticorpos foram avaliados durante as imunizações por ELISA indireto. Após o desafio com cistos de *T. gondii* cepa ME-49, foram mensurados: produção de citocinas, lesões inflamatórias cerebrais, parasitismo total, escore inflamatório e curvas de sobrevivência dos animais. Todos os camundongos imunizados com proteínas recombinantes ou STAg em combinação com lipossomos mostraram um aumento gradual dos níveis de IgG total e IgG2a. Os níveis de IgG1 específico para BSR4 foram significativamente maiores que os outros grupos imunizados. Camundongos imunizados com STAg-Lip apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto que a imunização com BSR4-Lip demonstrou o menor efeito de proteção com apenas 60 % de sobrevivência. Como esperado o grupo não imunizado (apenas PBS), apresentaram a mais elevada taxa de mortalidade (44 %). O grupo PBS apresentaram os maiores níveis de produção de citocinas, após o desafio com parasitos de *T. gondii* da cepa ME 49 enquanto o grupo imunizado com BSR4-Lip obteve os mais baixos níveis de produção de citocinas. Os camundongos imunizados com SAG2A-Lip apresentaram o menor escore inflamatório e diferença estatisticamente significante não pode ser observada entre os outros grupos analisados. Assim, foi possível concluir que a proteína SAG2A ou STAg em combinação com lipossomos aumentou a proteção nos camundongos, enquanto a imunização com BSR4-lipossomo levou a uma diminuição da resposta imune contra o parasito *T. gondii*.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, lipossomo, imunização, STAg, SAG2A, BSR4.

## Abstract

The *Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite that causes toxoplasmosis and is widely prevalent in humans and other animals. In this study we investigated the immunogenicity and protective efficacy of soluble antigen of *T. gondii*- STAg and the recombinant proteins SAG2A and BSR4. The proteins in combination with liposomes were administered intraperitoneally in C57BL/6 mice and the antibody levels were assessed during immunizations by ELISA. Following challenge with cysts of *T. gondii* ME-49 strain were measured: brain inflammatory lesions, total parasitism, inflammatory score and animals survival curves. All animals immunized with recombinant proteins or STAg in combination with liposomes showed a gradual increase in levels of total IgG and IgG2a. The levels of specific IgG1 to BSR4 were significantly higher than the other immunized groups. Mice immunized with Lip-STAg showed 100 % survival, whereas immunization with Lip-BSR4 showed the least protective effect with only 60 % survival. As expected the unimmunized group (PBS only) had the highest mortality rate (44 %). The PBS group showed higher levels of cytokine production, whereas the group immunized with Lip-BSR4 got the lowest levels of cytokine. The mice immunized with SAG2A-Lip showed lower inflammatory score and statistically significant difference could not be observed among the other groups analyzed. Then concludes that STAg or SAG2A protein in combination with liposomes enhanced protection in mice, whereas immunization with liposome-BSR4 led to a decrease in immune response against the parasite *T. gondii*.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, liposome, immunization, STAg, SAG2A, BSR4.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	1
1.1. Etiologia e ciclo evolutivo.....	1
1.2. Transmissão .....	2
1.3. Infecção e patogênese .....	3
1.4. Resposta imune.....	5
1.5. Imunoprofilaxia .....	8
1.4. Lipossomos .....	11
<b>2. Objetivos.....</b>	15
2.1. Objetivos geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
<b>3. Material e Métodos.....</b>	16
3.1. Animais e critérios éticos .....	16
3.2. Produção de antígeno solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i> (STAg) e proteínas recombinantes.....	16
3.3. Preparação do adjuvante lipossomal.....	18
3.4. Microscopia eletrônica .....	19
3.5. Macrófagos derivados de medula óssea .....	19
3.6. Imunização utilizando proteínas em combinação com lipossomos.....	20
3.7. Determinação dos níveis de anticorpos IgG e isótipos IgG1 e IgG2a .....	21
3.8. Desafio com cepa ME-49 de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	22
3.9. Determinação de citocinas pós-infecção .....	22
3.10. Ensaios histopatológicos e imunohistoquímica.....	23
3.11 Análise estatística .....	24
<b>4. Resultados .....</b>	25
4.1. Produção do antígeno solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i> - STAg e das proteínas recombinantes SAG2A e BSR4.....	25
4.2. Lipossomos oligolamelares são capazes de incorporar BSA-FITC e induzir fagocitose em macrófagos derivados de medula óssea murina .....	26
4.2. Resposta imune humoral após vacinação com antígenos de <i>T. gondii</i> em combinação com adjuvante lipossomal .....	28
4.3. Proteção gerada pelos imunógenos após desafio com o parasita <i>Toxoplasma gondii</i> .....	30
4.4. Assinatura de citocinas e lesões inflamatórias cerebrais após a infecção com <i>Toxoplasma gondii</i> .....	32
<b>5. Discussão .....</b>	35
<b>6. Conclusões .....</b>	42
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	44

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Etiologia e ciclo evolutivo

A toxoplasmose é causada por um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa denominado de *Toxoplasma gondii*, que tem ampla distribuição mundial. Embora tenha sido descoberto há mais de um século, o estudo do ciclo de vida e importância clínica deste parasito passou a ser elucidado nos últimos quarenta anos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Este parasito apresenta capacidade de infectar células nucleadas de todos os animais de sangue quente, incluindo o homem (FLEGR; KODYM; TOLAROVA, 2000). Estima-se que aproximadamente um terço da população humana já entrou em contato com *T. gondii*, caracterizando esta infecção como cosmopolita (SIACHOQUE et al., 2006; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; BLADER; SAEIJ, 2009).

Seu ciclo de vida é heteroxeno facultativo e compreende uma fase de reprodução sexuada que ocorre no tecido enteroepitelial dos felídeos, após a ingestão de cistos teciduais ou oocistos do parasito, sendo então considerados hospedeiros definitivos, mas eventualmente podem se infectar com formas taquizoítas sendo hospedeiros intermediários (DUBEY, 2004; DUBEY, 2008; KIM et al., 2008).

O ciclo parasitário assexuado ocorre nos tecidos de aves e mamíferos, incluindo o homem. Nesta fase observam-se predominantemente dois estágios de desenvolvimento, sendo um de replicação rápida e outro de crescimento lento, denominados taquizoítas e bradizoítas respectivamente. (KIM et al., 2008; POLLARD et al., 2008). Estas duas formas evolutivas também se diferenciam em função da resposta imunológica do hospedeiro. (LYONS; McLEOD; ROBERTS, 2002; FUX et al., 2007).

O parasito *T. gondii* apresenta morfologicamente três formas infectantes: esporozoíto, bradizoíto e taquizoíto. O taquizoíto é uma forma proliferativa com rápida multiplicação e alta capacidade de invasão responsável pela fase aguda da infecção e consequentemente pela sintomatologia. (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2008). O bradizoíto possui metabolismo lento e é responsável pela infecção crônica, estando presente em cistos teciduais no hospedeiro, incluindo tecidos do sistema nervoso central e muscular. Geralmente, causam poucos danos para o indivíduo imunocompetente e persiste viável por longos períodos no organismo em que parasita, sendo a forma principalmente responsável pela transmissão da zoonose (DUBEY, 1987; DUBEY, 1998; FLEGR; KODYM; TOLAROVA, 2000).

## 1.2. Transmissão

Existem três modos principais da transmissão da toxoplasmose na espécie humana. A principal dá-se pela via oral através da ingestão de carnes cruas ou mal cozidas de ovinos, suíños e caprinos contendo cistos teciduais e pela ingestão de oocistos contaminantes em alimentos e água (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000, ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Esta rota de transmissão está relacionada a hábitos culturais, alimentares e ainda com precariedade no controle do saneamento, além disso, é de grande importância por ser responsável pela maior taxa de transmissão da toxoplasmose, levando a diferenças significativas na prevalência mundial deste parasito (HUNTER; SIBLEY, 2012).

A transmissão vertical ou transplacentária está associada à infecção ou reinfecção durante o curso gestacional (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; CARRUTHERS, 2002), sendo a via de transmissão que merece maior atenção da saúde pública, uma vez que resulta na toxoplasmose congênita. Uma infecção pré-existente antes da gravidez

pelo parasito *T. gondii* geralmente previne a transmissão vertical, devido à capacidade destas mulheres, geralmente imunes, em induzir uma resposta protetora também para o feto (FATOOHI et al., 2002). Porém, se a gestante apresentar doenças imunodepressoras ou estiver sob uso de drogas imunossupressoras, pode ocorrer a reativação da infecção crônica a partir da conversão de bradizoítas em taquizoítas, que podem eventualmente atravessar a placenta (TREES; WILLIAMS, 2005; RORMAN et al., 2006). Apesar de rara, tem sido relatada a transmissão pela amamentação durante a fase aguda da doença, devem ser consideradas ainda, as transmissões por transplantes de órgãos e transfusões sanguíneas (EBRAHIM et al., 2014).

### **1.3. Infecção e patogênese**

Quando um hospedeiro se infecta, ocorre a disseminação do *T. gondii* por todo o organismo, por meio das vias sanguínea e linfática (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Após o parasito ser ingerido por via oral, ocorre a invasão ativa nas células epiteliais do intestino delgado, iniciando seu ciclo de reprodução, este é o evento central da infecção, sendo semelhante a todos integrantes do filo Apicomplexa (ROSS et al., 1994). Para facilitar a entrada nas células hospedeiras, o parasito em sua forma taquizoíta dispõe de uma superfamília de proteínas de superfície que medeiam a adesão e a invasão celular (LEKUTIS et al., 2001). Além disso, o processo de invasão envolve também a participação de receptores específicos e de proteínas liberadas pelas micronemas, roptrias e grânulos densos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2011).

Durante a fase crônica da toxoplasmose as proteínas expressas pelo bradizoíta estão relacionadas com a manutenção do parasito no hospedeiro. Estas formas encistadas, são responsáveis pelos títulos sorológicos que geralmente se mantêm por

toda a vida do hospedeiro (KAWAZOE, 2002; CRAWFORD et al., 2009; KIM; KARASOV; BOOTHROYD, 2007; VAN et al., 2007).

A patogênese do parasito e as consequências clínicas da infecção estão associadas ao estado imunológico, a predisposição genética, bem como, ao número e à virulência dos parasitos transmitidos (BLACK; BOOTHROYD, 2000; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A toxoplasmose adquirida em pacientes com o sistema imunológico competente geralmente tem curso benigno e auto limitante de caráter, portanto assintomático. Porém, indivíduos imunodeprimidos sob o efeito de drogas imunossupressoras, portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) ou mesmo transplantados podem apresentar as formas clínicas da doença (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Nestes casos a toxoplasmose é, na maioria das vezes, causada pela recrudescência ou reativação de cistos latentes. Em linhas gerais os sintomas mais comuns incluem febre, confusão mental, dor de cabeça, convulsões, náuseas, falta de coordenação motora e até coma, levando o paciente a morte. A encefalite causada pelo *T. gondii* é uma manifestação clínica mais comum da toxoplasmose entre as pessoas infectadas pelo HIV e em quase todos os casos, é resultado da reativação de infecção crônica iniciada por depressão da imunidade (DUBEY, 2008; LEWDEN et al., 2014).

Dentre os quadros clínicos da doença a toxoplasmose ocular é geralmente associada a retinocorioidites e pode ser resultado de infecção por natureza congênita ou adquirida. A infecção ocular leva a lesões inflamatórias agudas da retina, deixando cicatrizes e sintomas que incluem dor nos olhos, fotofobia, hiperemia conjuntival, visão turva e até perda progressiva de visão (COMMODARO et al., 2009).

A infecção transplacentária pode ser considerada a forma mais grave da doença, estando associada à transmissão vertical, da mãe infectada para o feto em

desenvolvimento (TREES; WILLIAMS, 2005). Após a transmissão, o parasita multiplica-se na placenta e atinge tecidos fetais, resultando frequentemente em a morte intrauterina, retardo mental, defeitos oculares, hidrocefalia ou microcefalia, corioretinite e calcificações intracranianas. (SABIN, 1949; KRAVETZ, 2010).

#### **1.4. Resposta imune**

Em indivíduos imunodeficientes o sistema imunológico não pode controlar a replicação do parasita *T. gondii* e os resultados clínicos da doença (FUENTES et al. 2001). Porém, em hospedeiros mais saudáveis, após a invasão parasitária ocorre o desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora mediada principalmente por células que exerce um papel preponderante no controle da infecção e também há participação da resposta humoral em que anticorpos controlam a disseminação de taquizoítas extracelulares (GAZZINELLI et al. 1993; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Enquanto a resposta adaptativa não é requerida, os componentes da imunidade inata determinam a susceptibilidade inicial e resultado da infecção, podendo controlar a infecção independente da ativação de células T, através do receptor Toll like 11 via MyD88 produzindo IL-12 e IFN-  $\gamma$  (SCANGA et al., 2002; YAROVINSKY et al., 2005; HOU et al., 2011; KOBLANSKY et al., 2013; STURGE et al., 2014).

Na imunidade inata há participação de células NK de linhagem linfocitária com função citotóxica que ao secretarem INF- $\gamma$ , ativam fagócitos que produzem por sua vez interleucina-12 (IL-12) que estimulam a liberação de IFN- $\gamma$ , controlando assim a infecção parasitária (YAROVINSKY, 2014). Esta resposta precoce com ativação inicial das células NK e outras células imunitárias do hospedeiro visa limitar a rápida replicação das formas taquizoítas e também tem como papel direcionar a resposta imune para o tipo Th1 mediado por células (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-

MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005). Isso acontece através do estabelecimento de uma rede de citocinas necessárias para responder à infecção pelo *T. gondii*, associada à ação de apresentação de抗ígenos, a ser realizada pelas células dendríticas, macrófagos e células hospedeiras infectadas (BLISS et al. 1999).

Os抗ígenos de *T. gondii* podem ser apresentados tanto para linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, quanto linfócitos B, com produção de citocinas IL-1, IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; BOPHALE, 2003). A citocina IFN- $\gamma$  tem papel essencial na indução e manutenção da resposta imune nas fases aguda e crônica; uma de suas principais funções é a indução da liberação de óxido nítrico posterior à ativação de macrófagos (SUZUKI et al., 1988; DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

O sucesso de *T. gondii* depende do balanço entre a resposta do hospedeiro e imunomodulação do parasito. O sistema imune deve controlar a infecção e ao mesmo tempo evitar danos teciduais, desta forma a produção de citocinas anti-inflamatórias é essencial para minimizar os danos causados por processos imunopatológicos (MILLER et al., 2009).

Na resposta humoral para a ativação de plasmócitos é necessária a participação dos linfócitos T CD4+ Th2 através da produção de citocinas tais como IL-4. São necessários ainda, sinais acessórios de moléculas de superfície, como o ligante CD40 expresso nas células T, o qual se liga ao CD40 constitutivamente expresso pelas células B. Os linfócitos B humanos produzem cinco isótipos de anticorpos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Os anticorpos IgG e IgA podem ser subdivididos em subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Todas as classes, com exceção de IgG4, podem ativar a via clássica do complemento (TOELLNER et al. 1998). Os anticorpos produzidos combatem o parasito neutralizando ou opsonizando os taquizoítas extracelulares. Os

anticorpos produzidos também podem utilizar como estratégia a ativação da via clássica do sistema complemento (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Os plasmócitos produzem IgA precocemente a partir do contato do parasito com a mucosa intestinal do hospedeiro e assim os linfócitos sensibilizados neste microambiente podem levar à produção desta classe de imunoglobulina em outras regiões que não de mucosa (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Esta imunoglobulina é característica de fase aguda de infecção e apesar de não atravessar a barreira placentária, pode ser detectada em recém-nascido quando a infecção congênita se dá após o primeiro trimestre de gestação (KOTRESHA; NOORDIN, 2010).

O anticorpo IgM é produzido nos primeiros meses de infecção, sendo considerado sinal de infecção recente, inclusive quando detectado em recém-nascidos, uma vez que este anticorpo não atravessa a barreira placentária e não se encontra no colostrum (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

A principal classe de imunoglobulina envolvida na resposta imune é a IgG, sendo esta característica de uma fase mais crônica da infecção. Algumas subclasses de IgG também participam do combate ao parasito. Em humanos há a predominância de IgG1 na resposta humoral e níveis menores de IgG2, IgG3 e IgG4. Estes anticorpos estão presentes em baixos níveis em infecções recentes, mas com o transcorrer do tempo sua concentração e sua avidez são aumentadas (CAMARGO et al., 1991; CANDOLFI et al., 2007).

## 1.5. Imunoprofilaxia

Até o presente momento, não existem vacinas comerciais contra a toxoplasmose em humanos. Apenas uma vacina comercial denominada "Toxovax" foi licenciada para o uso em ovelhas, sua composição é baseada em taquizoítas viáveis da cepa S48 e é considerada patogênica para humanos (HISZCZYNSKA-SAWICKA et al., 2014).

Muitos estudos têm se concentrado na formulação de vacinas eficazes contra o *T. gondii*, que direcionem os antígenos a serem apresentados ao sistema imunológico estimulando uma proteção adequada a fim de controlar e eliminar o parasita do hospedeiro por indução de imunidade celular e humoral (BHOPALE, 2003; YAROVINSKY, 2014).

O grande desafio está na busca de imunógenos eficazes para as formulações vacinais. Diversos modelos de imunizações vêm sendo estudados a fim de avaliar as respostas imunológicas geradas aos diferentes antígenos. Pesquisas propõem vacinas contra a toxoplasmose que contenham antígenos expressos em diferentes fases do ciclo de vida do parasito, podendo ser esses antígenos, parasitas vivos, organismos atenuados (WALDELAND; FRENKEL, 1983), antígenos particulados (INNES; VERMEULEN, 2006), proteínas purificadas de membrana (GRIMWOOD; SMITH, 1996), lisados de parasita, peptídeos ou ainda proteínas recombinantes e material genético (BENMOHAMED et al., 2002; EL-MALKY et al., 2014; RODRÍGUEZ-GASCÓN; POZO-RODRÍGUEZ; SOLINÍS; 2014). De acordo com a literatura, todos estes modelos vêm sendo testados visando desenvolver um protocolo de imunização eficiente e aplicável (LIU et al., 2012; VERMA; KHANNA, 2013).

É verdade afirmar que as vacinas com antígenos solúveis lisados do parasita são as mais comuns devido à sua praticidade na confecção. O antígeno solúvel de taquizoíto é descrito em diversos estudos desde a década de 90 até atualmente (YAP et al., 1998;

ELSAID et al., 1999; MA et al., 2009; BENEVIDES et al., 2013). Pesquisas com o antígeno solúvel de bradizoíta ou cistos também vem sendo abordados, principalmente em comparação ao antígeno solúvel de taquizoíto (ELSAID et al., 1999; ROJOMONTEJO et al., 2011).

Vacinas baseadas em peptídeos e proteínas recombinantes apresentam vantagens potenciais, quando comparadas às vacinas convencionais, em termos de pureza e especificidade na resposta imune. Letscher- Bru et al., (1998) utilizaram os antígenos rSAG1 para a imunização, porém foi preciso a adição de interleucina-12 para a indução de uma resposta de perfil Th1 e portanto efetivamente protetora. Lee et al., (2007) obtiveram como resultado proteção parcial aos camundongos inoculados com SAG3 recombinante em imunizações para toxoplasmose em modelos murinos. Da mesma forma, Yang et al., (2004) optaram por um protocolo de vacinação com as proteínas SAG1 e SAG2 produzidas pela tecnologia recombinante e após a infecção com o parasito foi possível observar a proteção parcial induzida por estes antígenos.

A vacina de DNA, por sua vez possui a vantagem de ser direcionada contra uma única proteína e ainda induzir a produção endógena do imunógeno. Este tipo de antígeno tem sido a escolha de muitos pesquisadores para a elaboração de imunizações experimentais (LI et al., 2014). Martin e colaboradores em 2004 utilizaram o gene da proteína de grânulo denso GRA4 em seu protocolo de imunização e observaram que este imunógeno foi parcialmente protetor. Chen e colaboradores e Chu; Piao; Aosai em 2014 obtiveram proteção parcial ao empregarem os genes de TgROP9 e HSP70, respectivamente. No mesmo ano Cong et al., utilizaram a estratégia de imunização com DNA contendo múltiplos epítópos e também constataram proteção semelhante (CONG et al., 2014).

Além de vacinas de DNA, são utilizados vetores atenuados vivos para a entrega do antígeno. O primeiro relato de um vetor utilizado para a entrega de um antígeno de *T. gondii* foi em 1999 quando Supply e colaboradores imunizaram ovelha com *Mycobacterium bovis* expressando GRA1. Desde então diversos vetores com diferentes antígenos de *T. gondii* são utilizados (CAETANO et al., 2006; MACHADO et al., 2010; MENDES et al., 2013) induzindo também proteção satisfatória.

Vale ressaltar que são testados genes ou proteínas de diversos componentes do parasito: grânulos densos e roptrias como GRA4, ROP2, ROP9 (MARTIN et al., 2004; CHEN et al., 2014) e micronemas como a MIC8 empregada por Li et al., (2014). Alguns autores descrevem também imunizações com receptores de proteínas como o receptor de ativação de proteína kinase 1 (rTgRACK1) utilizado por Wang e colaboradores também em 2014.

Muitos estudos se concentram na superfamília de proteínas SRS (sequências relacionadas SAG1), que constituem antígenos de superfície ancorados à membrana do parasito por âncoras de GPI, alguns dos quais identificados como candidatos a imunógenos em estudos de vacinação (NAGEL; BOOTHROYD, 1989; DZIERSZINSKI et al., 2000). Eles incluem antígenos de superfície de taquizoítos e bradízoitos: SAG1, SAG2A, SAG2C / D, BSR4, SRS2 e SRS9 envolvidos no processo de invasão celular e manutenção no organismo (MINEO; KASPER, 1994; SILVA et al., 1998; MACHADO et al., 2010; WANG; YIN, 2014).

Recentemente, foi descrito SAG2A como uma molécula bastante antigênica e potencialmente imunogênica capaz de induzir resposta imune inata e adaptativa no hospedeiro, podendo ser promissora para o diagnóstico da toxoplasmose (CUNHA-JÚNIOR et al., 2010; MACÊDO-JÚNIOR et al., 2013) e eventualmente para a confecção de vacinas. Os estudos na literatura com foco em antígenos de *T. gondii*

exclusivamente expressos na forma bradizoíta são escassos. Pesquisas anteriores mostraram que a proteína BSR4 está provavelmente relacionada com a manutenção do parasita no hospedeiro (VAN et al., 2007; GRUJIC; GRIGG; BOULANGER, 2008). O membro SRS9 da família de proteínas de SRS desempenha um papel importante na persistência do parasita no tecido cerebral e no controle da replicação do parasita no intestino (KIM; KARASOV; BOOTHROYD, 2007). BSR4 é considerada filogeneticamente homóloga à proteína SRS9 (CRAWFORD et al., 2009), portanto, merece atenção e mais estudos são necessários visando entender o papel desta molécula em vacinas experimentais.

Além do antígeno utilizado, ao desenvolver um protocolo de imunização, devem ser consideradas outras questões como: adjuvante, linhagem do parasito, dose do inóculo, via de administração e linhagem do camundongo. Em relação ao adjuvante deve-se considerar a capacidade imunoestimulatória da vacina como aspecto fundamental para o sucesso do procedimento, por isso é preciso levar em conta as propriedades imunomodulatórias dos adjuvantes empregados (WATSON; ENDSLEY; HUANG, 2012). Em várias pesquisas em modelo murino, o tradicional adjuvante completo de Freund ainda é utilizado (KASPER et al., 1985). Por outro lado, muitos estudos têm optado pelo emprego de adjuvantes lipídicos em combinação com抗ígenos diversos, inclusive抗ígenos purificados de *T. gondii* que encapsulados em vesículas lipossomais demonstraram um aumento da resposta protetora ao parasito (ALEXANDER; ROBERTS; BREWER, 1993).

## 1.6. Lipossomos

Os lipossomos são estruturas vesiculares esféricas constituídas por bicamada fosfolipídica separada por um domínio aquoso. Esta característica anfifílica permite a

encapsulação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas nos lipossomos (RANADE, 1989; ARAÚJO et al., 2003). Os lipossomos foram inicialmente produzidos por Alec Bangham na década de 60. Contudo, em 1965 essas estruturas esféricas foram denominadas como lipossomos por Weissman (ALEC; BANGHAM, 1995) e iniciaram-se as pesquisas aplicadas destas estruturas lipídicas como carreadores de drogas, hidratantes e mais tarde como adjuvantes vacinais.

Na década de 80 nomenclatura dos lipossomos passou a considerar número de lamelas ou bicamadas lipídicas envolvidas na composição lipossomal, bem como, o tamanho (SZOKA; PAPAHADJOPoulos, 1980). Assim, as vesículas constituídas por várias bicamadas lipídicas e com diâmetro que varia de 400 a 3500 nm foram denominadas multilamelares (MLV- *multi lamellar vesicles*). Já, as vesículas classificadas como unilamelares grandes (LUV- *large unilamellar vesicles*) constituem apenas uma bicamada lipídica, com diâmetro superior a 100 nm. Por sua vez, as vesículas unilamelares pequenas (SUV- *small unilamellar vesicles*) variam de 20 a 50 nm de diâmetro (SANTOS; CASTANHO, 2002; ARAÚJO et al., 2003; BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Tanto o tamanho, lamelaridade quanto a carga influenciam na atividade adjuvante e farmacocinética dos lipossomos, uma vez que podem alterar o encapsulamento a biodistribuição e a interação com as células, refletindo consequentemente na resposta biológica induzida no organismo (JIAO et al, 2003; FOGED et al, 2004; KUWANA et al., 2005; BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Os lipossomos podem ser administrados *in vivo* devido a sua baixa toxicidade e alta biocompatibilidade, uma vez que são preparados a partir de fosfolipídios idênticos aos de membranas celulares de mamíferos (LETSCHER- BRU et al., 1998;

BASOMBA, et al, 2002). É comum a combinação de fosfolipídios com esteróis, como colesterol, já que estes são facilmente reconhecidos e eliminados pelos fagócitos mononucleares (VEMURI; RHODES, 1995; AKBARZADEH et al, 2013). Neste contexto, a incorporação de colesterol nas preparações lipossomais podem produzir modificações nas propriedades físico-química da bicamada lipídica aumentando da rigidez e da estabilidade da mesma (VEMURI; RHODES, 1995; LIAN; HO, 2001; ELSAYED et al., 2007).

As preparações lipossomais podem variar na sua confecção e consequentemente na sua função. Um estudo mostrou que LPD (cationic liposome-polycation DNA) induz o aumento dos níveis de expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 e também relatou que DOTAP exibe atividade semelhante de indução destas moléculas nas células dendríticas (CUI; HAN; VANGASSERI; HUANG, 2005). Outros trabalhos demonstram ainda lipossomos inibindo a resposta inflamatória a LPS, como é o caso do Lipo F ao interferir na ligação com seu receptor TLR4 (LEON-PONTE et al., 2005). As preparações lipossomais com diC14-amidine podem ainda estar envolvidas na prevenção de alergias de acordo com Jacquet et al (2005). Além disso, alguns lipossomos podem ser utilizados em terapias gênicas, como o DOPE demonstrado por Wasungu e Hoekstra em 2006.

Preparações a partir de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) têm sido utilizadas como adjuvantes vacinais, no sentido de aumentar a imunogenicidade dos抗ígenos (FARHOOD; SERBINA; HUANG, 1995; LONEZ; VANDENBRANDEN; RUYSSCHAERT, 2008; ZOHRA; CHOWDHURY; AKAIKE, 2009). Além disso, sabe-se que a associação dos lipossomos aos抗ígenos, permite o reconhecimento destes抗ígenos protéicos tanto por moléculas de MHC de classe I como MHC de classe II em APCs, podendo

estimular respostas imunológicas tanto celulares como humorais (ZHOU; HUANG, 1994; RAO; ALVING, 2000).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta imunológica aos抗ígenos STAg, SAG2A, BSR4 e SAG2A/BSR4 em combinação com lipossomos em camundongos C57BL/6 posteriormente infectados com a cepa ME-49 do parasito *Toxoplasma gondii*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Produção de antígeno solúvel de *T. gondii* e de proteínas recombinantes SAG2A e BSR4;
- Produzir lipossomos oligolamelares a partir de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC);
- Verificar a incorporação dos抗ígenos proteicos pelas vesículas lipossomais;
- Determinar os níveis de anticorpos IgG e subclasses IgG1 e IgG2a produzidos após imunização;
- Verificar o perfil de citocinas séricas após imunização com as proteínas de interesse e desafio com o parasito *T. gondii* da cepa ME-49;
- Analisar a sobrevida dos animais imunizados e posteriormente infectados com *T. gondii*;
- Avaliar o parasitismo cerebral e os danos teciduais causados pelo parasito em camundongos imunizados com as proteínas do estudo em combinação com lipossomos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais e critérios éticos**

Foram utilizados 72 camundongos da cepa C57BL/6 e 3 camundongos da linhangem Swiss, sendo todos fêmeas de oito semanas de idade.. A manutenção e conservação dos camundongos foi realizada de acordo com os princípios éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais para a ética animal (número de protocolo 042/2009).

#### **3.2. Produção de antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg)**

Taquizoítos da cepa RH foram mantidos por passagens seriadas em camundongos Swiss por 48 às 72h. Os exsudatos peritoneais dos camundongos infectados foram coletados e lavados com PBS, em seguida foram processados na presença de inibidores de protease para obtenção do antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) como descrito por (SANTANA et al., 2012).

#### **3.3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes SAG2A e BSR4**

Brevemente, o DNA de taquizoíto de *T. gondii* da cepa RH foi utilizado como molde para a amplificação dos genes: sequência de SAG1 related sequence 2- SAG2A (Genebank: AAO72427) ou Bradzoyte related sequence 4 -BSR4 (NCBI Ref: XP\_002369885). Para isto utilizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir dos seguintes primers: 5'- CAAGTCGCTCATATGTCCACCACCG -3'/ 5'- ACTTCGCAAAGCTTCTCCGAAAG- 3' para SAG2A e 5'-

CAGGCTGTTGCTCATATGCT - 3'/ 5'- GGCGGCGGATCCCTAGGCTG- 3' para BSR4.

Foram utilizados 50 ng de DNA genômico de taquizoítas da cepa RH, 80 pmol de cada primer; 0,25 mmol/L de dNTPs, 2,0 unidades de Taq DNA Polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá), Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,2, KCl 10 mmol/L, (NH4)2SO4 6 mmol/L, Triton X-100 0,1% (v/v) e soro albumina bovina (BSA) 10 µg/mL, para um volume final de 100 µL. As condições de reação adotadas foram: 2 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos (45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 48 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C) e extensão final de 5 minutos a 72 °C. A reação procedeu-se em termociclador modelo MJ Research PLTC-200 (GMI Inc, St. Paul. USA). O fragmento amplificado de aproximadamente 607 pb foi purificado com o kit Accuprep PCR purification (Bioneer Corporation, Daejeon, Coréia do Sul).

Os produtos SAG2A e BSR4 foram digeridos e inseridos nos sítios NdeI/HindIII e NdeI/ BamHI dos vectores pET28ae pET14b respectivamente. Os vetores resultantes contendo as sequências codificando SAG2A (pET28a) e BSR4 (pET14b) fundidos com a sequência his-tag, foram inseridos em bactérias *Escherichia coli* da cepa BL21 (DE). A bactéria BL21 (DE) transformada foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 50 µg/ml de kanamicina para SAG2A e 50 µg/ml de ampicilina para BSR4, a 37 °C até atingir uma densidade óptica (DO) de 0,5 a 600 nm.

Para a expressão de proteínas, a cultura foi induzida com 0,5 mM de isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) durante 16 h a 20 °C. As células foram coletadas por centrifugação, o sedimento foi ressuspensão em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM de sacarose, 0,2% de Triton X-100 e 1 mM de PMSF), e submetido a criólise (seis ciclos) e sonicação (dez ciclos de 20 seg. a 90% da potência). Debris insolúveis da proteína SAG2A foram removidos por

centrifugação a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado. Por outro lado, o sobrenadante de proteína BSR4 foi descartado após esta etapa e o sedimento foi ressuspensionado no tampão de lise e novamente submetido à criólise e ultrassom, este passo adicional visou aumentar o rendimento da extração proteica. Em seguida, o extrato de cada proteína foi transferido para uma coluna de NTA-Ni (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha) previamente equilibrada em tampão fosfato 50 mM, pH 8,0. As proteínas não ligadas foram removidas por tampão de lavagem (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 300 mM, pH 8,0, Imidazol 10 mM). As proteínas de interesse foram eluídas da coluna com o mesmo tampão de equilíbrio, suplementado com 250 mM de imidazol. As frações coletadas de SAG2A e BSR4 foram dialisadas em PBS (SANTANA et al., 2012).

A fim de eliminar a contaminação por endotoxinas, todas as proteínas recombinantes purificadas passaram por cromatografia em resina Detoxi-gel (Thermo Scientific, Rockford, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade proteica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e as proteínas foram avaliadas a partir de eletroforese (LAEMMLI, 1970).

### **3.3. Preparação do adjuvante lipossomal**

O 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE); 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) (Lipoid, Ludwigshafen, Alemanha) e colesterol (Dishman, Veenendaal, Netherlands) foram dissolvidos em 50% de clorofórmio e 50% de metanol e, em seguida realizada uma preparação na razão de 3:1:1 (v:v). Os lipossomos foram preparados pelo método de reidratação de filme, como previamente descrito (BANGHAM, 1968).

Brevemente, o filme lipídico foi formado na superfície de vidro de um balão volumétrico, desidratado com injeção de gás nitrogênio e depois reidratado com PBS, pH 7,2, contendo proteínas como: BSA conjugado com FITC, STAg ou com as proteínas recombinantes (SAG2A, BSR4 ou SAG2A mais BSR4). Posteriormente, a fim de formar lipossomos oligolamelares, a solução lipídica foi submetida a dez ciclos de congelamento e descongelamento e também foi realizado um passo adicional de sonicação a 100 W durante 10 minutos, com intervalos de 30 seg. As preparações lipossomais foram então analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.

### **3.4. Microscopia eletrônica**

Os lipossomos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5 por 15 minutos, e, em seguida, pós-fixados com tetróxido de ósmio 2% por 1 h. Após a fixação, a preparação lipossomal foi centrifugada a 500<sub>x</sub>g e o sedimento foi ressuspêndido em agarose 3% a 50 °C. A preparação foi desidratada com diluições seriadas em álcool por 2 horas, o bloco de agarose foi embebido em resina Epson como descrito no protocolo do fabricante. Secções ultrafinas foram preparadas e armazenadas em micro telas para posterior análise por microscopia eletrônica. Todas as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Seis EM 109.

### **3.5. Macrófagos derivados de medula óssea**

Macrófagos derivados de medula óssea foram produzidos a partir de células-tronco da medula óssea de camundongos C57BL/6, como anteriormente descrito (MARIM; SILVEIRA; LIMA; ZAMBONI, 2010). As células foram cultivadas em placas de poliestireno, por período de 7 dias em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES 15 mM, bicarbonato de sódio 23 mM, 1 mM, L-glutamina, 20% de soro fetal de

bovino inativado pelo calor (SFB) e 30% meio condicionado de células L929 (ATCC® CCL-1™, NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] ).

Os macrófagos diferenciados foram removidos das microplacas, por pipetagem utilizando solução gelada de salina tamponada com fosfato, contados e cultivados em placas de cultura de 6 poços para experimentos com soro albumina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC, 1mg/mL) incorporada em lipossomos. Alternativamente, as células foram tratadas com lipossomos contendo BSA-FITC foram coradas com DAPI a 500 nM. Todas as imagens foram adquiridas e registradas no sistema de imagem de células EVOS (Life Technology, Carlsbad, CA, EUA).

### **3.6. Imunização utilizando proteínas em combinação com lipossomos**

Setenta e dois camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 semanas de idade, foram aleatoriamente divididos em seis grupos ( $n = 12$ ) e submetidos a diferentes vacinas de antígenos. Os animais foram imunizados três vezes via intraperitoneal, em intervalos de 15 dias de cada imunização. Cada grupo recebeu uma determinada formulação: Grupo 1: PBS; Grupo 2: STAg- Lipossomo; Grupo 3: SAG2A- lipossomo; Grupo 4: BSR4 em lipossomo; Grupo 5: SAG2A mais BSR4 em lipossomos; Grupo 6: lipossomos vazios.

A concentração antigênica de todas as preparações inoculadas foi de 25  $\mu$ g de antígeno/ camundongo em 100 mL de solução. Nas mesmas condições, mas sem o antígeno, o grupo 1 e 6 foram inoculados com 100  $\mu$ L de PBS e lipossomo vazio, respectivamente. As amostras de sangue de cada camundongo foram coletadas por punção do plexo orbital anteriormente às imunizações e ao desafio, nos dias 0, 15, 30 e 45. As amostras de soro foram armazenadas a -70 °C para futuras análises de IgG e isótipos IgG1 e IgG2a.

### **3.7. Determinação dos níveis de anticorpos IgG e isótipos IgG1 e IgG2a**

Os níveis dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a contra *T. gondii* foram mensurados por ELISA indireto. Resumidamente, placas de micro titulação de alta afinidade (Costar, Corning Incorporated, 96 poços) foram sensibilizadas com 5 µg/ml de抗ígenos em tampão carbonato 0,06 M , pH 9,6 e incubadas overnight a 4 °C. Após lavagens com PBS- T (PBS + 0,05 % de Tween 20), as placas foram bloqueadas com uma solução de (5% de leite desnatado em PBS- T) durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes e incubados com as amostras de soro de seis camundongos de cada grupo, diluídas na proporção 1:64 em PBS- T suplementado com leite desnatado a 1%, durante 2 h a 37 °C. Após seis lavagens, as placas foram incubadas com anti- IgG de camundongo produzido em cabra e conjugado com peroxidase (1:1000, Sigma) durante 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas novamente e a reação foi revelada com o substrato da enzima (0,03 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,01 M de ABTS).

Diferentemente, para a detecção de subclasses de IgG, após o bloqueio e incubação com amostras de soro, os poços foram incubados com os respectivos anticorpos secundários (Sigma): anti- IgG1 (1:250) e anti- IgG2a (1:250) 2 horas a 37° C. As placas foram lavadas e incubadas com anticorpo anti- IgG de camundongo produzida em cabra marcado com peroxidase (1:5000) por 30 min à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação foi revelada como descrito acima. As densidades ópticas para todas as reações foram medidas a 405 nm, os níveis de anticorpos foram expressos com o índice de ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: IE = DO amostras/ DO cut-off, tal como descrito previamente (CARDOSO et al., 2012). As amostras com valores IE ≥ 1,0 foram consideradas positivas.

### **3.8. Desafio com cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii***

O desafio dos camundongos previamente imunizados foi realizado com cistos de *T. gondii* cepa ME-49. Os cistos utilizados foram coletados a partir de cérebros de *Calomys Callosus* como previamente descrito (RIBEIRO et al., 2009). Os camundongos imunizados foram infectados por via oral com 10 cistos do parasito, duas semanas (quinze dias) após o último reforço da imunização. A seguir, os animais submetidos a imunização e infectados com parasitos da cepa ME49 foram monitorados quanto a mortalidade por período de 40 dias.

### **3.9. Determinação de citocinas pós-infecção**

As amostras de soro de três camundongos selecionados aleatoriamente em cada grupo de sobreviventes foram coletadas no 40º dia após a infecção e utilizadas para determinação da produção de citocinas. Os níveis de citocinas foram mensurados utilizando o kit comercial de citometria- Cytometric Bead Array (CBA Th1/Th2/Th17), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA), para avaliação da assinatura das citocinas (TNF, IL-6, IL-2, IL-4, IL10, IL-17 e IFN- $\gamma$ ).

No imunoensaio foram utilizadas microesferas com intensidades distintas de fluorescência, acopladas a anticorpo monoclonal específico para cada citocina. Após incubação com as amostras, as citocinas capturadas pelas beads foram detectadas por imunoensaio utilizando anticorpos monoclonais de detecção específicos para cada citocina e conjugados com ficoeritrina (PE). A partir da confecção de curvas padrões com concentrações conhecidas de cada citocina recombinante, foi possível determinar, por meio de citometria de fluxo, a concentração de citocinas em cada amostra sérica pela intensidade de marcação com PE. Os resultados gerados foram analisados pelo software FCAP array e expressos em pg/mL.

### **3.10. Ensaios histopatológicos e imunohistoquímica**

Secções obtidas dos tecidos cerebrais de animais sobreviventes após o desafio foram coradas com hematoxilina e eosina, conforme descrito anteriormente (BENEVIDES et al., 2008) e, em seguida, analisadas por microscopia para detectar danos teciduais. Os escores inflamatórios foram representados por infiltrado de células mononucleares no parênquima, nódulos gliais e meninges, como unidades arbitrárias: 0-1: leve; 1-2: moderada; 2-3: grave e >3: muito grave. Foi realizada a análise duplo-cega por dois ou mais pesquisadores utilizando o microscópio Olympus com objetiva de 40x.

O parasitismo cerebral foi quantificado por imunohistoquímica, tal como descrito (WELTER et al., 2007). Na reação as secções desparafinizadas foram submetidas a tratamento de micro-ondas com citrato-fosfato (pH 6,0) para a recuperação antigênica. As secções foram lavadas em PBS e, em seguida, incubadas por 30 min a 37 °C com 5 % de leite desnatado diluído em PBS, a fim de reduzir ligações inespecíficas. As lâminas foram incubadas em soros de camundongos contendo anticorpos contra *T. gondii* a 4 °C overnight. Após as lavagens, foram adicionados anticorpos secundários de cabra anti-IgG de camundongo biotinilados por 1 h a 37 °C.

As lâminas foram submetidas à etapa de lavagem adicional e incubadas com avidina - peroxidase (kit ABC, PK- 4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA). A reação foi revelada com 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Amresco, Solon, OH, EUA). Foi realizada a contra coloração das lâminas com hematoxilina de Harris, lavadas em água por 10 min, desidratadas em soluções de álcool seriadas, e em seguida, diafanizadas em xanol. As lâminas foram montadas em solução de entelan e analisadas no microscópio Olympus conforme já descrito. O parasitismo tecidual detectado por imunohistoquímica foi pontuado de acordo com os escores (GAZZINELLI et al., 1993),

através da contagem do número total de cistos e vacúolos parasitóforos em pelo menos 97 campos microscópicos por corte histológico utilizando uma objetiva de 40x.

### **3.11. Análise estatística**

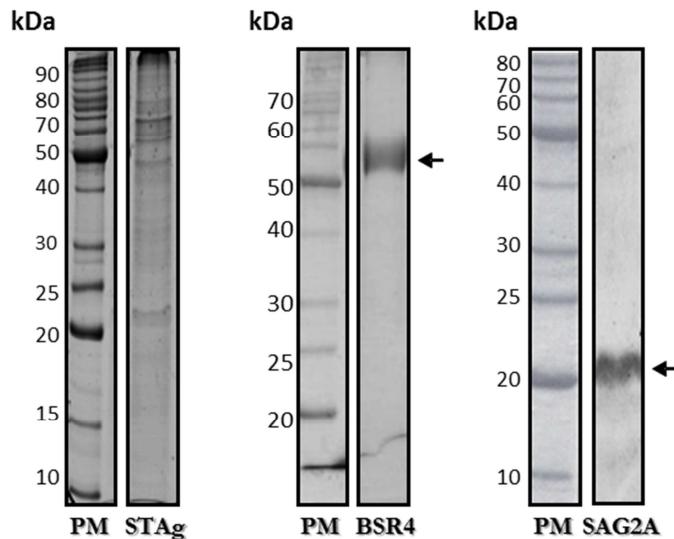
O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes em cada ponto após o desafio, e as curvas de sobrevida foram analisadas pelo teste de log rank. As diferenças estatísticas entre os grupos imunizados em relação à produção de anticorpos e de citocinas foram analisadas pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis, quando apropriado, seguido pelo pós-teste de Bonferroni ou Dunn, respectivamente.

Em todas as mensurações, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Produção de antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg) e das proteínas recombinantes SAG2A e BSR4

Os antígenos foram produzidos e analisados por eletroforese unidimensional. Na figura 1 é possível visualizar o STAg e as moléculas SAG2A e BSR4 produzidas como proteínas recombinantes de 22 e 54 kDa, respectivamente.



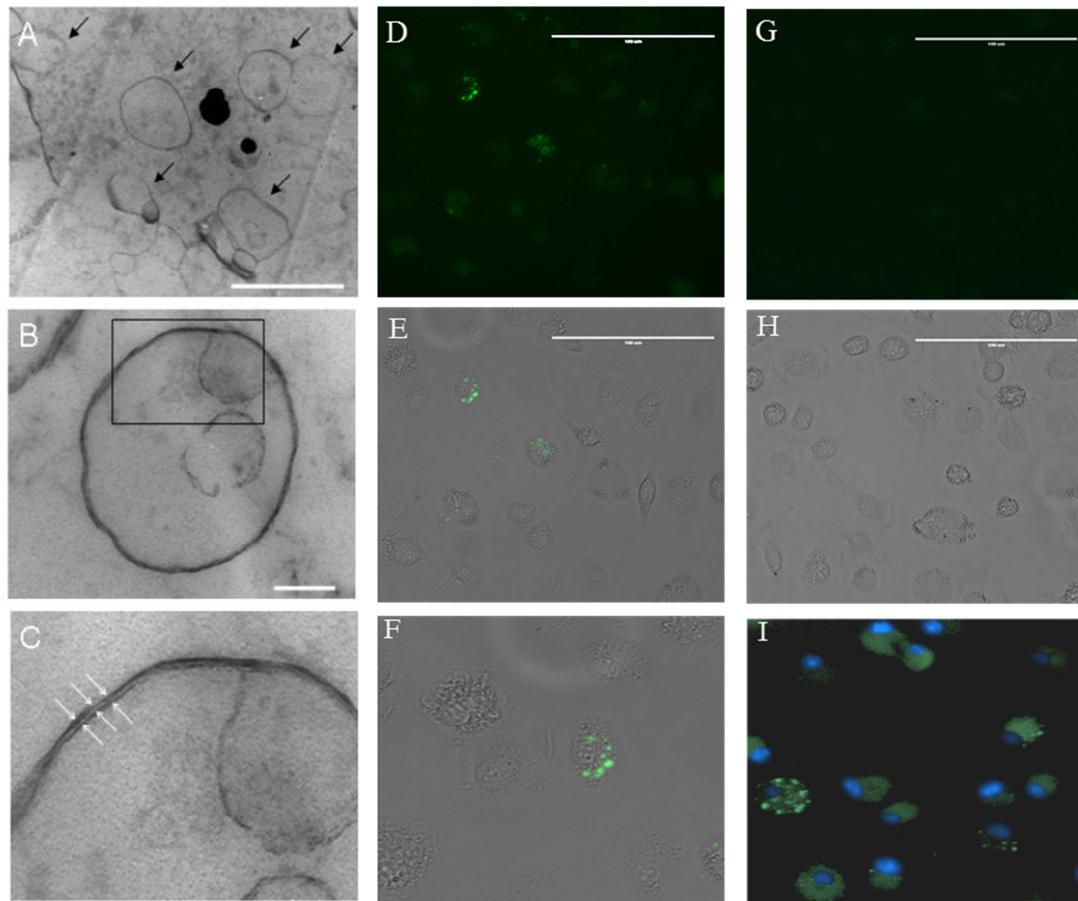
**Figura 1. Caracterização do perfil eletroforético dos antígenos produzidos**

Análise eletroforética dos antígenos utilizados na imunização de camundongos. Painel esquerdo - Perfil eletroforético do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg). Painel do meio- SDS-PAGE da proteína recombinante BSR4 (Sequência 4 relacionada a Bradzoitas) purificada de *T. gondii* Painel direito, SDS-PAGE da proteína purificada SAG2A recombinante (Sequência 2 relacionada a proteína SAG1) de *T. gondii*.

#### **4.2. Lipossomos oligolamelares são capazes de incorporar BSA-FITC e induzir fagocitose em macrófagos derivados de medula óssea murina**

Os lipossomos foram preparados a partir de DPPE, DPPC e colesterol pelo método de hidratação de filme com um passo adicional de tratamento por ultrassom (Figura 1). A preparação foi analisada por microscopia eletrônica e detectaram-se múltiplas vesículas lipídicas com bicamada de característica oligolamelar e tamanho heterogêneo, variando de escala nanométrica a micrométrica (Figura 2A-C).

A fim de avaliar a incorporação de抗ígenos proteicos, o filme lipídico foi reidratado com BSA conjugado com FITC e as formulações foram adicionadas à cultura de macrófagos derivados da medula óssea (Figura 2D-I). Como mostrado na Figura 2E-F e 2I, a maioria das células foram capazes de incorporar os lipossomos fluorescentes, o que indica que as vesículas oligolamelares produzidas neste estudo podem reter eficientemente抗ígenos proteicos ativando células fagocíticas. A figura G representa o controle de BSA-FITC em macrófagos, mas sem lipossomos e a figura I mostra a marcação com DAPI.



**Figura 2. Caracterização de lipossomos e proteínas.**

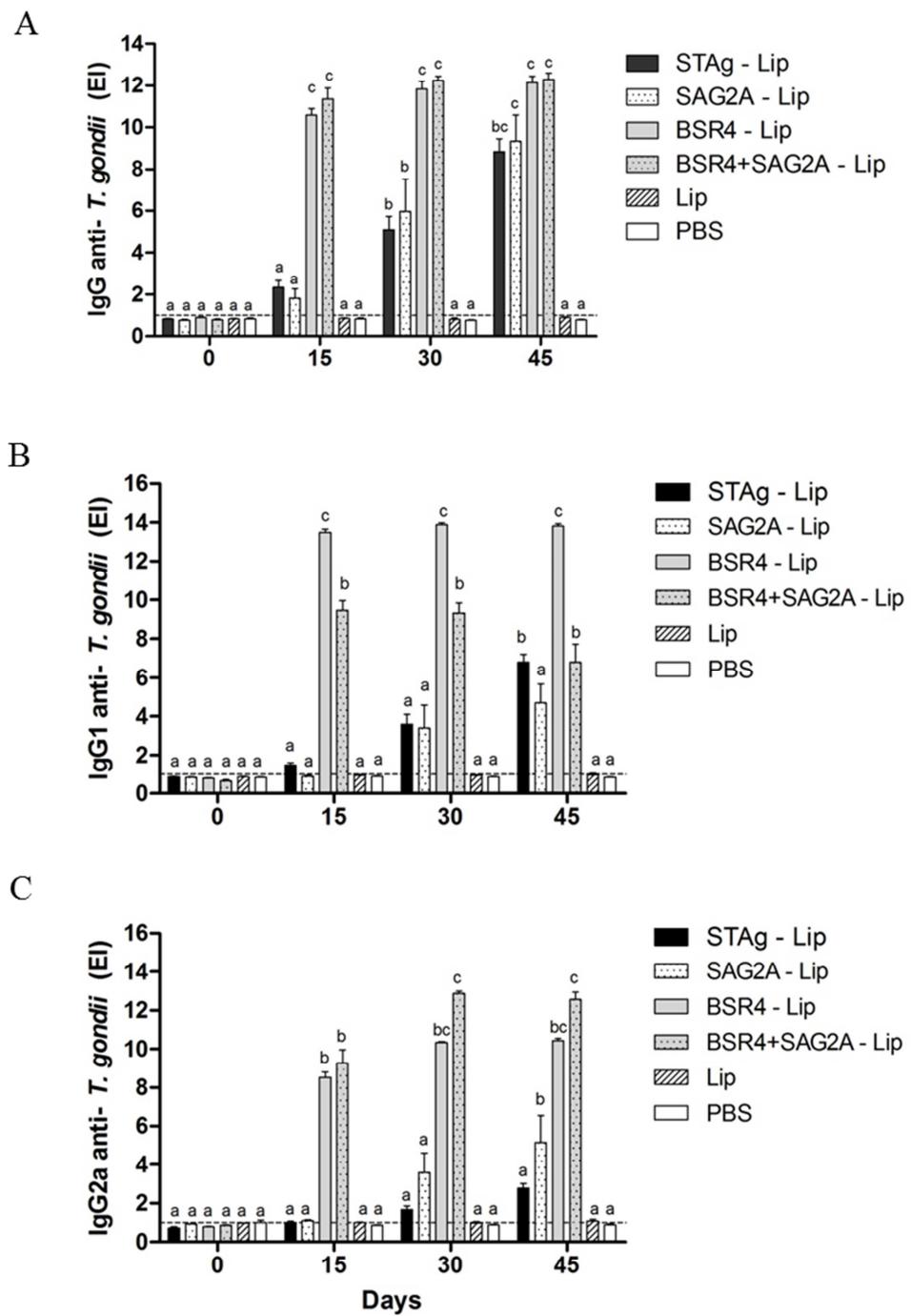
Na microscopia eletrônica da preparação dos lipossomos foi possível detectar múltiplas vesículas com bicamada lipídica com característica oligolamelar e tamanho heterogêneo, variando o diâmetro de escala nanométrica a micrométrica (Figura 2A-C). Em (A) as setas pretas mostram vários lipossomos numa escala de  $2\mu\text{m}$ . Na figura B o retângulo mostra a formação oligolamelar do lipossomo, enquanto em C as setas brancas demonstram claramente a bicamada da molécula numa escala de  $200\text{nm}$ . Fagocitose de lipossomos carreadores de BSA-FITC por macrófagos de camundongos (D, E, F) e BSA-FITC sozinho (G e H controle). Em I, macrófagos fagocitando lipossomos marcados com BSA-FITC (verde) e núcleos corados pelo DAPI (azul), respectivamente.

#### **4.3. Resposta imune humoral após imunização com antígenos de *T. gondii* em combinação com adjuvante lipossomal**

Todos os animais imunizados com proteínas recombinantes ou STAg em combinação com lipossomos mostraram um aumento gradual dos níveis totais de IgG para *T. gondii* do 15º ao 45º dia após a imunização.

Animais imunizados com BSR4 - Lip ou BSR4/SAG2A- Lip apresentaram níveis de IgG total significativamente mais elevados em comparação com todos os outros grupos do 15º ao 45º dia após a imunização ( $p < 0,05$ ). Os grupos imunizados com SAG2A- Lip e STAg- Lip foram particularmente responsivos a partir do 30º dia (Figura 3A). Resposta imune humoral semelhante foi observada para os anticorpos IgG2a específicos para a STAg e SAG2A, em que estas imunoglobulinas apenas foram detectadas nos dias 30 e 45 após a imunização (Figura 3C).

Como mostrado na figura 3B, no 15º após o último reforço vacinal, os níveis de IgG1 específico para BSR4 foram significativamente maiores que os outros grupos imunizados e manteve-se elevado até ao dia 45 ( $p < 0,01$ ). Curiosamente, a imunização com BSR4 + SAG2A - Lip também induziu uma forte resposta imune humoral precoce. Os níveis de IgG1 específico para BSR4 + SAG2A- Lip foram significativamente superiores aos observados para o STAg ou SAG2A no dia 15 e 30 após a imunização ( $p < 0,05$ ). Como esperado, os grupos controle PBS ou lipossomo por si só não produziram uma resposta imune humoral a antígenos de *T. gondii*.



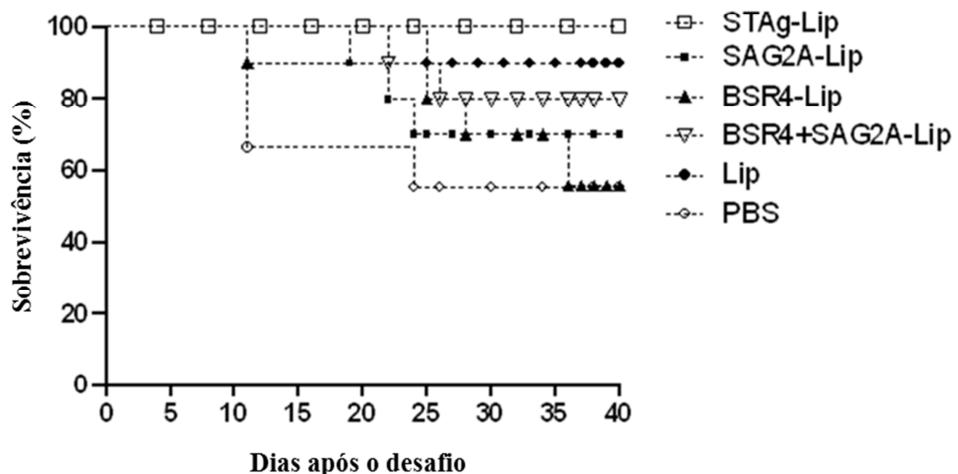
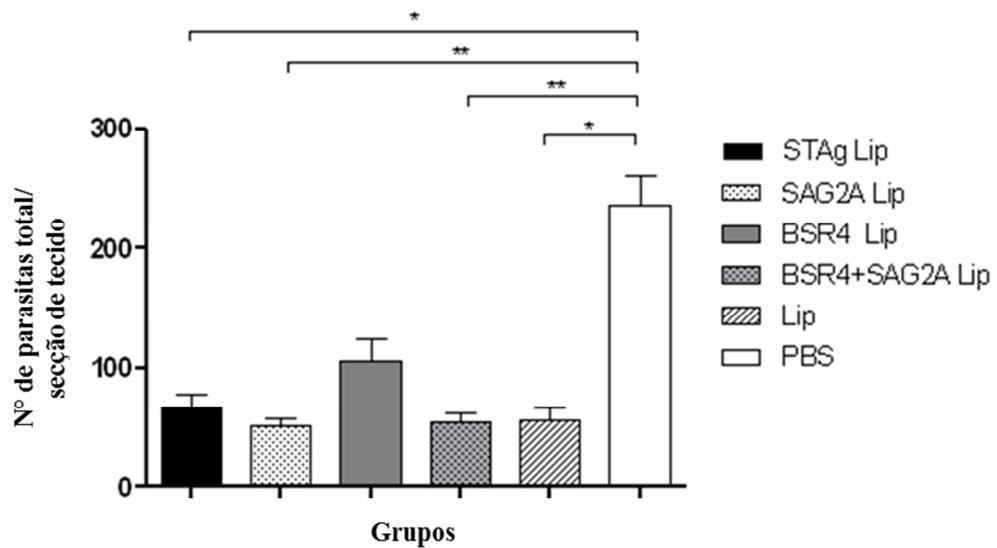
**Figura 3. Níveis de imunoglobulina anti-*T. gondii* de camundongos C57BL / 6 imunizados.**

Os camundongos foram imunizados via intraperitoneal com STAg-Lip, SAG2A-Lip, BSR4-Lip, BSR4 + SAG2A-Lip, Lip (controle de adjuvante) e PBS (controle sem antígeno), em três doses em intervalos regulares de 15 em 15 dias. As amostras de soro foram coletadas em 0, 15, 30 e 45 dias após a imunização. Os níveis de IgG (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) foram determinados por meio de ELISA e expressos com média  $\pm$  SEM. Letras diferentes (a-c) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em cada momento analisado.

#### **4.4. Proteção gerada pelos imunógenos após desafio com o parasito *Toxoplasma gondii***

Após o desafio com 10 cistos de *T. gondii* cepa ME-49, a porcentagem de sobrevivência de camundongos imunizados e infecção cerebral foram avaliadas. Como demonstrado na figura 4, os camundongos imunizados com STAg - Lip apresentaram 100 % de sobrevivência, enquanto que o grupo que recebeu Lip sozinho ou BSR4+ SAG2A em combinação com lipossomo revelou 90 % e 80 % de sobrevivência, respectivamente. A imunização com SAG2A - Lip produziu uma proteção parcial permitindo a sobrevivência de 70 % dos animais. Em contraste, a imunização com BSR4- Lip mostrou um efeito protetor menor, com apenas 60 % de sobrevivência dos camundongos. Como esperado, o grupo não imunizado (apenas com PBS), apresentou a mais elevada taxa de mortalidade (44 %), com 30 % dos animais de morrendo em fase inicial de infecção (Figura 4A).

O parasitismo cerebral dos animais sobreviventes da infecção por *T. gondii* foi avaliado por imunohistoquímica (Figura 4B). O parasitismo cerebral foi significativamente inferior nos animais que imunizados com STAg - Lip ( $p < 0,05$ ), SAG2A - Lip ( $p < 0,01$ ) e BSR4 + SAG2A- Lip ( $p < 0,01$ ) e Lip ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo controle preparado apenas com PBS. O grupo BSR4 - Lip apresentou o maior grau de parasitismo cerebral quando comparado como os outros grupos imunizados utilizando outras proteínas como imunógeno. Embora, detectada uma ligeira redução no parasitismo cerebral no grupo BSR4 em comparação com o controle PBS, não foi observada diferença estatisticamente significante entre os dois grupos.

**A****B**

**Figura 4. Curvas de sobrevivência e carga parasitária cerebral de camundongos C57BL/6 após desafio com *Toxoplasma gondii*.**

Seis grupos de camundongos (10 animais por grupo) foram imunizados com STAg-Lip, SAG2A-Lip, BSR4-Lip, BSR4 + SAG2A-Lip, Lip (controle do adjuvante) ou PBS (controle sem antígeno). Os animais foram desafiados com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, 15 dias após a última imunização. A mortalidade dos grupos de camundongos foi analisada (A). E a carga parasitária no cérebro dos camundongos tratados com as diferentes composições e posteriormente infectados pelo parasito, foi avaliada por ensaio de imunohistoquímica resultando na figura B.

#### **4.5. Assinatura de citocinas e lesões inflamatórias cerebrais após a infecção com *Toxoplasma gondii***

A produção de citocinas foi avaliada no 40º dia após a infecção com 10 cistos do parasito *T. gondii* cepa ME-49 por animal, utilizando amostras de soros de três animais por grupo (Figura 5A). O grupo PBS apresentou os maiores níveis de produção de citocinas com valores significativamente mais elevados em comparação com outros grupos, sendo particularmente alto para as citocinas: TNF, a IL - 6, IL - 17 e IL - 10 ( $p > 0,001$ ). Moderada a alta produção de citocinas foi observada nos grupos imunizados com lipossomos (LIP) ou STAg- Lip. Uma gradual redução foi observada nos grupos tratados com SAGA - Lip, BSR4 + SAG2A - Lip e BSR4 - Lip (Figura 5A) para todas as citocinas analisadas. Embora estas diferenças tenham sido claramente observadas em nossa análise, não foi considerada estatisticamente significante. Apresentou diferença estatística, o grupo imunizado com BSR4 – Lip que exibiu uma menor produção de IL-2, em comparação com os grupos PBS e Lip.

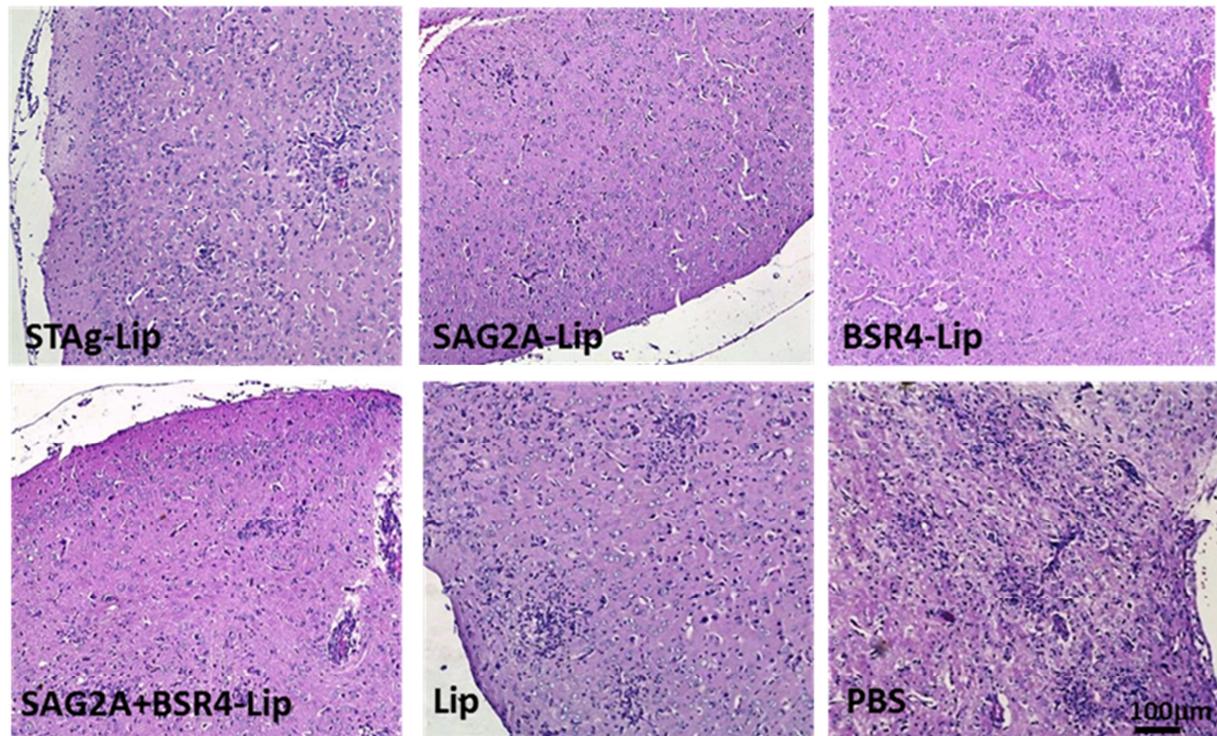
A análise histopatológica foi efetuada no dia 40 após a infecção, a fim de determinar lesões inflamatórias cerebrais (Figura 6A e B). Todas as amostras de tecido apresentaram lesões no cérebro que foram caracterizadas por infiltrado de células mononucleares no parênquima, nódulos gliais e meninges. Os camundongos imunizados com SAG2A- Lip mostraram menor escore inflamatório em comparação com os grupos PBS e Lip. Não foi observada diferença estatisticamente significante entre os outros grupos analisados.

STAg-Lip	SAG2A-Lip	BSR4-Lip	BSR4+SAG2A-Lip	Lip	PBS	
262.0	183.6	84.2	367.9	248.3	2661.5	<i>TNF</i>
122.2	189.4	44.6	61.4	234.7	1241.5	<i>IL-6</i>
81.4	44.9	3.61	13.7	58.7	346.3	<i>IL-17</i>
14.9	6.59	0.47	3.1	17.5	42.43	<i>IL-2</i>
21.6	12.4	1.9	5.9	15.7	49.7	<i>IL-4</i>
653.4	939.7	129.2	176.9	1116.1	7314.8	<i>IL-10</i>
104	227	87	118	192	780.9	<i>IFN-gama</i> (pg/mL)

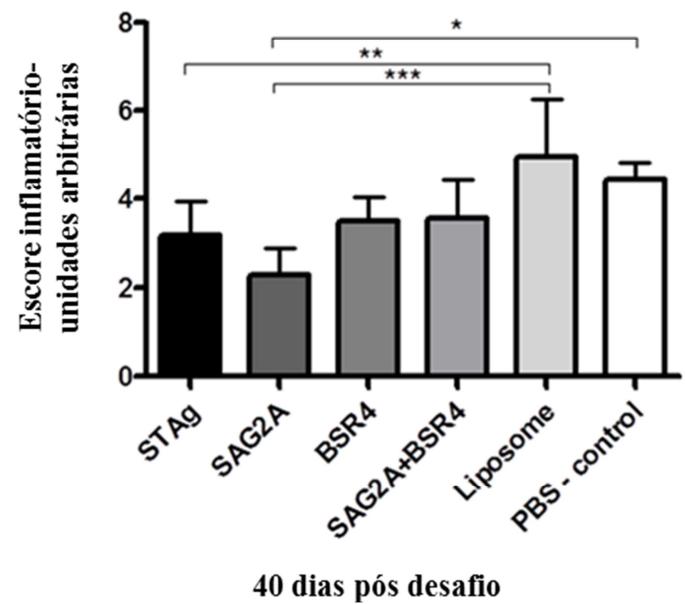
**Figura 5. Produção de citocinas séricas dos animais imunizados e desafiados com a cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii***

Os animais imunizados com seis diferentes formulações: STAg-Lip, SAG2A-Lip, BSR4-Lip, BSR4+SAG2A-Lip, Lip (controle do adjuvante) e PBS (controle sem antígeno), foram avaliados em relação a produção de citocinas após o desafio com 10 cistos da cepa ME-49 do parasito *T. gondii*. Os níveis de citocinas foram mensurados utilizando o kit comercial de citometria- Cytometric Bead Array (CBA Th1/Th2/Th17).

A



B



**Figura 6. Escore inflamatório de tecidos cerebrais do cérebro de camundongos C56BL/6 após desafio**

Em A fotomicrografias representativas dos ensaios histológicos em tecidos cerebrais de camundongos pertencentes aos seis grupos tratados. Coloração com Hematoxilina e eosina. Escala: 100 mm. Em B, escore inflamatório de camundongos C57BL / 6 infectados com 10 cistos de *T. gondii*. Os dados foram obtidos a partir de três camundongos por grupo analisando pelo menos 97 campos microscópicos por secções do cérebro utilizando uma objectiva de 40 x. \* Valores significativamente diferentes foram obtidos nos grupos lipossomo e SAG2A-lipossomo; lipossomo e STAg lipossomo ( $p < 0,05$ ; comparação múltipla pós-teste ANOVA e Bonferroni).

## 5. DISCUSSÃO

Aproximadamente um terço da população mundial está exposto ao *T.gondii*. Este protozoário é considerado um dos parasitas mais importantes pela saúde médica e veterinária, porém a toxoplasmose continua a ser uma doença negligenciada. Considerando-se que, atualmente, não existem vacinas para toxoplasmose, pesquisas que visem o desenvolvimento de imunizações eficazes contra esta doença são necessárias (LIU; SINGLA; ZHOU, 2012; VERMA; KHANNA, 2013).

Vários estudos experimentais demonstram o uso potencial de proteínas recombinantes para o desenvolvimento de vacinas contra a toxoplasmose (MINEO; KASPER, 1994; LETSCHER-BRU et al., 1998; MACHADO et al., 2010). No entanto, pesquisas relatam que proteínas com sequências relacionadas à SAG1 (SRS) recombinantes apresentam um efeito imunogênico inferior quando comparadas às proteínas SRS naturais (STRIEPEN et al., 1997). Esta diferença pode ser explicada pela estrutura proteica associada a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas moléculas com âncoras de GPI parecem desempenhar um papel importante na invasão da célula hospedeira, na modulação e evasão da resposta imune (LEKUTIS et al., 2001), reforçando a importância da porção GPI como adjuvante natural em abordagens experimentais para o desenvolvimento de novas vacinas contra a toxoplasmose (NAGEL; BOOTHROYD, 1989).

Sendo assim, ao utilizar proteínas produzidas pela tecnologia recombinante, é recomendável a associação com adjuvantes (LETSCHER- BRU et al., 1998; MARTIN et al., 2004; LEE et al., 2007). Neste estudo utilizamos as proteínas recombinantes incorporadas a adjuvantes com base em lipossomos, visando incrementar a imunogenicidade das formulações vacinais testadas e, assim, aumentar a proteção contra

a infecção por *T. gondii* (BADIEE et al., 2009; CHEN et al., 2009; TANAKA et al., 2014)

Os lipossomos têm sido amplamente utilizados como carreadores de proteínas ou peptídeos uma vez que induzem o aumento da produção de moléculas coestimuladoras e citocinas características do perfil Th1 (ALVING, 1991; RONGEN; BULT; BENNEKOM, 1997; COPLAND; RADES; DAVIES; BAIRD, 2005; LONEZ; VANDENBRANDEN; RUYSSCHAERT, 2008). Além disso, sabe-se que a associação de antígeno/ lipossomo pode ser apresentada pelas APCs tanto por MHC de classe I e II estimulando respostas imunes celulares e humorais, respectivamente (ZHOU; HUANG, 1994; RAO; ALVING, 2000).

No presente estudo, foram utilizadas as proteínas STAg, SAG2A e BSR4 de *T. gondii* em combinação com lipossomos. Um trabalho anterior identificou por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, 11 tipos de proteínas antigênicas em STAg, o que demonstra uma alta antigenicidade e possível imunogenicidade para o desenvolvimento de vacinas para toxoplasmose (MA et al., 2009). A capacidade protetora de STAg tem sido elucidada, como no trabalho de Yap e colaboradores em 1998 que foi demonstrada proteção parcial em modelos murinos imunizados com STAg e desafiados com a cepa RH de *T. gondii*. Além disso, mecanismos de proteção em mucosa induzidos pelo pré-tratamento com STAg foram recentemente destacados por Benevides e colaboradores (2013), demonstrando recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> para compartimentos intraepiteliais e consequente diminuição das respostas patológicas na infecção por *T. gondii*. De maneira semelhante, Elsaid et al (1999) demonstraram uma resposta protetora de STAg quando este foi utilizado como imunógeno em modelos murinos. Este fenômeno também foi confirmado pelo presente estudo que constatou que o grupo de animais imunizados com STAg em combinação com lipossomos apresentou

100% de sobrevivência. Esta proteção pode ser explicada pela alta produção de imunoglobulinas e síntese moderada de citocinas induzida por STAg que pode ser considerado promissor em modelos experimentais de imunizações ao induzir resposta imune humoral e celular contra o parasito.

Além do lisado total de *T. gondii*, foi avaliada neste trabalho a capacidade protetora da proteína recombinante SAG2A. Em estudos anteriores deste grupo de pesquisa, foi possível demonstrar a antigenicidade e potencial utilização desta proteína em ensaios de imunodiagnóstico para infecção por *T. gondii* (BÉLA et al., 2008; SANTANA et al., 2012). Diante disso, visamos abordar a molécula SAG2A em relação à imunogenicidade e possível utilização em experimentos de imunizações em camundongos.

Outros pesquisadores já haviam desenvolvido estudos utilizando SAG2A como um componente de vacina, especialmente em combinação com a proteína SAG1 (YANG; CHANG; CHAO, 2004; LAU; THIRUVENGADAM; LEE; FONG, 2011) e obtiveram resultados satisfatórios na indução de resposta protetora. Similarmente Machado et al (2010) utilizaram a estratégia de “*prime and boost*” com influenza e adenovírus como vetores codificando SAG2, em um protocolo de imunização que induziu uma resposta protetora forte em modelos de camundongos. Nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que camundongos imunizados com a proteína recombinante SAG2A em combinação com adjuvante lipossomal, foram protegidos parcialmente da infecção por cistos de *T. gondii* ao apresentarem taxa de sobrevivência de 70%, carga parasitária e escore inflamatório baixos, produção anticórpica alta e níveis moderados de citocinas.

A proteína BSR4 aqui abordada se difere da molécula SAG2A ao ser expressa, em maior quantidade na fase bradizoíta de *T. gondii*, uma vez que a codificação do gene

BSR4 é regulada positivamente nesta fase de desenvolvimento do parasito (VAN et al., 2007). Kim, Karasov e Boothroyd (2007) demonstraram que BSR4 desempenha um papel importante na manutenção do parasita no interior do cérebro e está também relacionada com a replicação e reativação do parasita. Apesar do avanço dos estudos sobre função e estrutura dessa molécula na biologia do protozoário, não há relatos da proteína BSR4 utilizada como antígenos em abordagens vacinais experimentais até o presente trabalho.

Neste estudo, a proteína BSR4- Lip apresentou resposta humoral forte nas fases iniciais da infecção e revelou um perfil distinto entre os isotipos IgG1 e IgG2a, com predomínio de IgG1. Estes animais tratados com a proteína BSR4 foram os únicos que apresentaram uma produção ininterrupta de IgG1 do dia 15 ao dia 45, o que sugere uma polarização da resposta para o perfil T herper 2. Apesar de induzir forte resposta humoral, os camundongos imunizados com BSR4 não foram capazes de induzir resposta celular eficiente, apresentando níveis muito baixos de citocinas. Estas observações podem ser comparadas ao estudo de Di Cristina et al (2004), que avaliou a resposta contra os antígenos MAG1 e BAG1 e constatou que a resposta humoral contra antígenos bradizoítas de *T. gondii* ocorrem na fase inicial da infecção em seres humanos.

Consideramos também avaliar o comportamento imunogênico da combinação da molécula BSR4 com a proteína de taquizoíta SAG2A em lipossomos. Porém os resultados não diferiram significativamente dos grupos imunizados apenas com BSR4, reproduzindo a alta resposta humoral e baixa produção de citocinas. Rojo-Montejo e colaboradores (2011) avaliaram a proteção fornecida pela imunização com antígenos de taquizoítas ou taquizoítas em associação com bradizoítas de *Neospora caninum*, parasito filogeneticamente semelhante ao *T. gondii*. De forma semelhante não obtiveram

sucesso com proteínas de bradizoíta como imunógenos, e os animais imunizados com antígenos de ambas as fases de desenvolvimento parasitário apresentaram maior morbidade e mortalidade. Os autores sugerem que essa proteção ineficiente pode ser explicada pelo alto nível de resposta humoral em detrimento a resposta celular gerada. Elsaïd et al (1999) investigaram a capacidade de proteção de três grupos de imunógenos em associação com lipossomos: antígeno solúvel de taquizoíta; antígeno solúvel cisto e a mistura de taquizoíta mais antígeno solúvel de cisto. Neste estudo os autores demonstraram que, embora a combinação de ambos os antígenos provoque um aumento da resposta humoral e redução do número de cistos cerebrais, os resultados não foram estatisticamente significantes quando comparados com os outros dois grupos imunizados com antígenos isolados.

Curiosamente, em nosso estudo, os animais imunizados com lipossomos vazios apresentaram proteção parcial à infecção parasitária. Esta proteção moderada é provavelmente devido a respostas imunológicas mediadas por células, mas não a respostas humorais. Corroborando com Aramaki et al (1995), que demonstraram que lipossomos não elevam os níveis de IgM específicos a ovalbumina (OVA), mas podem promover a produção de IL- 12, ativando consequentemente o perfil Th1, com a secreção de IFN-  $\gamma$ , e desta maneira induzindo uma resposta imunológica protetora contra a infecção por *T. gondii* em camundongos. Badiée et al (2009) elucidaram a capacidade dos lipossomos como adjuvante em vacina contra a Leishmaniose. No seu estudo, os camundongos imunizados com lipossomos revelaram uma carga parasitária significativamente menor em comparação ao grupo de animais que receberam PBS como controle. Em contraste, em nosso estudo, não houve diminuição parasitária nos grupos tratados com lipossomos vazios, mas a redução no número de parasitas pode ser

observada claramente no grupo imunizado com lipossomos em combinação com a proteína recombinante SAG2A.

Mais recentemente, Tanaka et al (2014) mostraram resultados encorajadores, ao utilizarem profilina encapsulada em lipossomos revestidos por oligomanose. Esta composição, quando utilizada como imunógeno, reforçou a imunidade protetora contra *T. gondii* em modelo murino. A taxa de sobrevivência dos camundongos imunizados com a proteína encapsulada em lipossomos revestidos por oligomanose foi significativamente maior do que a do grupo controle tratado apenas com PBS, mostrando o efeito imunomodulador dos lipossomos.

Em relação ao perfil de citocinas, vale ressaltar o IFN- $\gamma$ , considerado um marcador de imunidade protetora na toxoplasmose, (SUZUKI; ORELLANA; SCHREIBER; REMINGTON, 1988; BRANDÃO et al., 2009) que atua no controle de infecção aguda e crônica, diminuindo a disseminação do parasito na fase aguda e evitando a reativação deste em fases tardias (ALIBERTI, 2005). A IL-2 por sua vez pode induzir a produção de IFN- $\gamma$  numa resposta secundária ao patógeno, reforçando o papel de IFN- $\gamma$  no controle de *T. gondii* (SA; WOODWARD; SUZUKI, 2013). Chen et al., 2009, observaram que os camundongos imunizados com pGRA4 encapsulada em lipossomo provocou o aumento na produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2, com esta resposta sendo modulada para o perfil Th1 foi constatada menor carga parasitária na imunização composta por lipossomos como adjuvantes e consequentemente houve maior porcentagem de sobrevivência destes animais após o desafio com o parasito.

De acordo com isso, no presente estudo foi possível observar a importância de IFN- $\gamma$  e IL-2 na promoção de uma resposta protetora pelo hospedeiro. Os resultados da produção de citocinas por parte dos grupos de animais aqui avaliados, imunizados com

formulações diferentes, se refletem no parasitismo, e na mortalidade de camundongos. Os animais do grupo controle, inoculados com tampão PBS, e do grupo BSR4 - Lip tiveram um maior nível de parasitismo por secção de tecido e, consequentemente, também apresentaram os menores índices de sobrevivência, corroborando com o estudo de Elsaïd e colaboradores (1999). Estes resultados são, provavelmente, relacionados ao perfil de citocinas produzido, de modo que os animais tratados com PBS produziram os mais altos níveis de citocinas, em contraste ao grupo de animais imunizados com a proteína BSR4 em combinação com lipossomos, que obtiveram os níveis mais baixos de citocinas após o desafio com o parasito. Isto demonstra que a proteção é promovida com mais êxito quando o antígeno induz uma resposta imunológica com produção balanceada de citocinas, evitando produção exacerbada de citocinas inflamatórias no hospedeiro após infecção com parasitas de *T. gondii*.

Em nosso protocolo de imunização para toxoplasmose em modelo murino a proteína SAG2A e o antígeno solúvel de *Toxoplasma*- STAg em combinação com lipossomos exibiram um efeito imunoestimulatório reforçando a proteção dos camundongos infectados por 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, enquanto a vacinação com BSR4-Lipossomo aparentemente induziu uma diminuição da resposta imune protetora contra o parasito. Esta imunomodulação induzida pela proteína de bradizoíta BSR4, nunca havia sido descrita e os mecanismos subjacentes a esta molécula podem ser alvo de futuras investigações a cerca da biologia desta fase desenvolvimental do parasito *T. gondii*.

## 6. CONCLUSÕES

- A confecção de lipossomos oligolamelares a partir dos fosfolipídios: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC); 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) e colesterol foi alcançada com sucesso;
- As vesículas lipossomais produzidas foram capazes de incorporar a proteína BSA conjugada com FITC e induziram fagocitose em macrófagos derivados de medula óssea murina;
- Foi realizada a preparação do antígeno solúvel de *T. gondii* e produção das proteínas SAG2A e BSR4 pela tecnologia recombinante, para incorporação em lipossomos e administração intraperitoneal em camundongos C57BL/6;
- Os animais imunizados com STAg e as proteínas recombinantes em combinação com lipossomos apresentaram aumento gradual nos níveis de IgG total a partir do 15º dia;
- Os grupos de camundongos imunizados com BSR4- Lip ou BSR4 + SAG2A- Lip apresentaram resposta imune humoral precoce com predomínio de IgG1;
- Após do desafio com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, os camundongos imunizados com STAg- Lip apresentaram 100% de sobrevivência, baixo parasitismo cerebral e score inflamatório significativamente mais baixo que o grupo controle Lipossomo;
- Os animais tratados com SAG2A- Lip apresentaram proteção parcial, 70% de sobrevivência, baixo parasitismo cerebral e o mais baixo score inflamatório significativamente diferente dos grupos controle Lipossomo e PBS; o grupo imunizado com BSR4 + SAG2A- Lip, por sua vez apresentou alta taxa de sobrevivência, com baixo parasitismo cerebral apesar de escore inflamatório alto;

- A produção de citocinas 40 dias após o desafio foi particularmente alta para o grupo PBS; moderada para os grupos lipossomos (LIP) ou STAg- Lip com uma gradual diminuição nos grupos tratados com SAGA - Lip, BSR4 + SAG2A - Lip e BSR4- Lip;
- Foi possível concluir que o antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) em combinação com lipossomos promoveu uma proteção a toxoplasmose em modelo murino, nas nossas condições experimentais, enquanto que imunização com proteína BSR4 em formulação lipossomais produziu uma diminuição da resposta imune contra infecção por *Toxoplasma gondii*.

## 7. REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; NEJATI-KOSHKI. K. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 1, p. 102, 2013.
- ALEC, D.; BANGHAM, M. D. Surrogate cells or Trojan horses. The discovery of liposomes. **BioEssays**, v. 17, p. 1081-1088, 1995.
- ALEXANDER, J.; ROBERTS, C.W.; BREWER, J.M. Progress towards the development of a vaccine against congenital toxoplasmosis: identification of protective antigens and the selection of the appropriate adjuvants. **Toxoplasmosis**, v. 78 p. 217-229, 1993.
- ALIBERT, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 162-170, 2005.
- ALVING, C. R. Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. **Journal of Immunological Methods**, v. 1, p. 1-13, 1991.
- ARAMAKI, Y.; Suds, H.; Tsuchiya, S. Interferon- $\gamma$  inductive effect of liposomes as an immunoadjuvant. **Vaccine**, v. 13, p. 1809-1814, 1995.
- ARAÚJO, D. R.; PINTO, L. M. A.; BRAGA, A. F. A.; PAULA, E. Drug-delivery Systems for local Anesthetics: Therapeutic Applications. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, p. 663-671, 2003.
- BADIEE, A.; JAAFARI, M. R.; KHAMESIPOUR, A.; SAMIEI, A.; SOROUSH, D.; KHEIRI, M. T.; BARKHORDARI, F.; MCMASTER, W. R.; MAHBOUDI, F. The role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of Leishmania (rgp63). **Experimental Parasitology**, v. 4, p. 362-369, 2009.
- BANGHAM, A. D. Membrane models with phospholipids. **Progress in Biophysics Molecular Biology**, v. 18, p. 29-95, 1968.
- BASOMBA, A.; ROJAS, D. H. F.; ALAMAR, R.; PRADO, J. M. P. Allergen vaccination with a liposome encapsulated extract of *Dermatophagooides pteronyssinus*: A randomized, double-blind, placebo controlled trial in asthmatic patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, p. 943-948, v. 109, 2002.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BÉLA, S. R.; OLIVEIRA SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; REIS DE CARVALHO, F.; CARRIJO DE OLIVEIRA, T.; MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a

diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 3, p. 245-254, 2008.

BENEVIDES, L.; MILANEZI, C. M.; YAMAUCHI, L. M.; BENJAMIM, C. F.; SILVA, J. S.; SILVA, N. M. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. **The American Journal of Pathology**, v. 3, p. 741-751, 2008.

BENEVIDES, L.; CARDOSO, C. R.; MILANEZI, C. M.; CASTRO-FILICE, L. S.; BARENCO, P. V.; SOUSA, R. O.; RODRIGUES, R. M.; MINEO, J. R.; SILVA, J. S.; SILVA, N. M. *Toxoplasma gondii* soluble tachyzoite antigen triggers protective mechanisms against fatal intestinal pathology in oral infection of C57BL/6 mice. **PLoS One**, v. 9, 2013.

BENMOHAMED, L.; URN, A.; WECHSLER, S. L.; NESBURN, A. B. Lipopeptide vaccines-yesterday, today, and tomorrow. **Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 425-431, 2002.

BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease**, v. 4, p. 213-222, 2003.

BHOPALE, G. M. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 457-462, 2003.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 607-623, 2000.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. J. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta Pathological Microbiological and Immunological Scandinava**, v. 117, p. 458-476, 2009.

BLISS, S. K.; MARSHAL, A. J.; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 7369-7375, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N.; GAZZINELLI, R. T.; CAETANO, B. C.; FERREIRA, A. M.; SILVA, L. A.; VITOR, R. W. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN-gamma and IL-10. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 241-245, 2009.

CAETANO, B. C.; BRUNA-ROMERO, O.; FUX, B.; MENDES, E. A.; PENIDO, M. L.; GAZZINELLI, R. T. Vaccination with replication deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces

immune response and protection against infection in mice. **Human Gene Therapy**, v. 4, p. 415-426, 2006.

CAMARGO, M. E.; DA SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidity of specific IgG antibodies as markers of recent primary infection caused by *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de medicina tropical de São Paulo**, v. 3, p. 213-218, 1991.

CANDOLFI, E.; PASTOR, R.; HUBER, R.; FILISETTI, D.; VILLARD, O. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 1, p. 83-88, 2007.

CARDOSO, M. R.; MOTA, C. M.; RIBEIRO, D. P.; NOLETO, P. G.; ANDRADE, W. B.; SOUZA, M. A.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose- binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. **Veterinary Research**, v. 29, p. 43-76, 2012.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111-122, 2002.

CHEN, R.; LU, S. H.; TONG, Q. B.; LOU, D.; SHI, D. Y.; JIA, B. B.; HUANG, G. P.; WANG, J. F. Protective effect of DNA-mediated immunization with liposome-encapsulated GRA4 against infection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Zhejiang University. Science B**, v. 7. p. 512-521, 2009.

CHEN, J.; ZHOU, D. H.; LI, Z. Y.; PETERSEN, E.; HUANG, S. Y.; SONG, H. Q.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii*: Protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 139, p. 42-48, 2014.

CHU, D.; MORODA, M.; PIAO, L. X.; AOSAI, F. CTL induction by DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-HSP70 gene. **Parasitology International**, v. 2, p. 408-4016, 2014.

CONG, H.; YUAN, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, L.; YIN, H.; ZHOU, H.; HE, S.; WANG, Z. Comparative efficacy of a multi-epitope DNA vaccine via intranasal, peroral, and intramuscular delivery against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 145, 2014.

COMMODOARO, A. G.; BELFORT, R. N.; RIZZO, L. V.; MUCCIO, C.; SILVEIRA, C.; BURNIER JR, M. N.; BELFORT JR, R. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, v. 2, p. 345-350, 2009.

COPLAND, M. J.; RADES, T.; DAVIES, N. M.; BAIRD, M. A. Lipid based particulate formulations for the delivery of antigen. **Immunology and cell Biology**, v. 2, p. 97-105, 2005.

CRAWFORD, J.; GRUJIC, O.; BRUIC, E.; CZJZEK, M.; GRIGG, M. E.; BOULANGER, M. J. Structural characterization of the bradyzoite surface antigen (BSR4) from *Toxoplasma gondii*, a unique addition to the surface antigen glycoprotein 1-related superfamily. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 14, p. 9192-9198, 2009.

CUI, Z.; HAN, S. J.; VANGASSERI, D. P.; HUANG, L. Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, p. 22-28, 2005.

CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; SOUZA, M. A.; SOUZA, G. R.; PRUDENCIO, C. R.; PIROVANI, C. P.; CEZAR M. CASCARDO J.; BARBOSA, B. F.; GOULART, L. R.; MINEO, J. R. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. **Immunobiology**, v. 1, p. 26-37, 2010.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 569-588, 1998.

DI CRISTINA, M.; DEL PORTO, P.; BUFFOLANO, W.; BEGHEITTO, E.; SPADONI, A.; GUGLIETTA, S.; PICCOLELLA, E.; FELICI, F.; GARGANO, N. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immuneresponses upon human infection. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 164-171, 2004.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **The Veterinary clinics of North America**, v. 17, p.1389-1404, 1987.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.

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 – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. v. 126, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. The History of *Toxoplasma gondii* - The First 100 Years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 467-475, 2008.

DZIERSZINSKI, F.; MORTUAIRE, M.; CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces **Molecular Microbiology**, v. 3, p. 574-582, 2000.

EBRAHIM ZADEH, A.; BAMEDI, T.; ETEMADI, S.; SHAHRAKIPOUR, M.; SARYAZDIPOUR, K. H. Toxoplasmosis as a complication of transfusion in

hemodialysis patients. **Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology**, v. 1, p. 22-25, 2014.

EL-MALKY, M. A.; AL-HARTHI, S. A.; MOHAMED, R. T.; EL BALI, M. A.; SAUDY, N. S. Vaccination with Toxoplasma lysate antigen and CpG oligodeoxynucleotides: comparison of immune responses in intranasal versus intramuscular administrations. **Parasitology Research**, 2014 [Epub ahead of print].

ELSAID, M. M.; VITOR, R. W.; FRÉZARD, F. J.; MARTINS, M. S. Protection against toxoplasmosis in mice immunized with different antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 485-490, 1999.

ELSAYED, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F.; KHALAFALLAH, N. M. Lipids vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, p. 1-16, 2007.

FARHOOD, H.; SERBINA, N.; HUANG, L. The role of dioleoyl phosphatidyl ethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1235, p. 289-295, 1995.

FATOOGHI, A. F.; COZON, G. J.; GREENLAND, T.; FERRANDIZ, J.; BIENVENU, J.; PICOT, S.; PEYRON, F. Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 704-707, 2002.

FLEGR, J.; KODYM, P.; TOLAROVA, V. Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii* infection with personality changes in women. **Biological Psychology**, v. 53, p. 57-68, 2000.

FOGED, C.; ARIGITA, C.; SUNDBLAD, A.; JISKOOT, W.; STORM, G.; FROKJAER, S. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. **Vaccine**, v. 22, p. 1903-1913, 2004.

FUENTES, I.; RUBIO, J. M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1566-1570, 2001.

FUX, B.; NAWAS, J.; KHAN, A.; GILL, D. B.; SU, C.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2580-2590, 2007.

GAZZINELLI, R. T.; ELTOUM, I.; WYNN, T. A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- and correlates with the down regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **The Journal of Immunology**, v. 151, p. 3672-3681, 1993.

GRIMWOOD, J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 2, p. 169-173, 1996.

GRUJIC, O. ; GRIGG, M. E.; BOULANGER, M. J. Insect-cell expression, crystallization and X-ray data collection of the bradyzoite-specific antigen BSR4 from *Toxoplasma gondii*. **Acta Crystallographica. Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 64, p. 425-527, 2008.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, p. 84-105, 2003.

HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E.; GATKOWSKA, J. M.; GRZYBOWSKI, M. M.; DŁUGOŃSKA, H. Veterinary vaccines against toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 7, p. 1-14, 2014.

HOU, B.; BENSON, A.; KUZMICH, L.; DEFARANCO, A. L.; YAROVINSKY, F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci** v. 1, p. 278-83, 2011.

HUNTER, C. A.; DAVID SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 766-778, 2012.

INNES, E. A.; VERMEULEN, A. N. Vaccination as control strategy against the coccidial parasites Eimeria, Toxoplasma and Neospora. **Parasitology**, v. 133, p. 145-168, 2006.

JACQUET, A.; VANDERSCHRICK, J. F.; VANDENBRANDEN, M.; ELOUAHABI, A.; MAGI, M.; GARCIA, L.; RUYSSCHAERT, J. M. Vaccination with the recombinant allergen ProDer p 1 complexed with the cationic lipid DiC14-amidine prevents allergic responses to house dust mite. **Molecular Therapy**, v. 6, p. 960-968, 2005.

JIAO, X.; WANG, R. Y.; FENG, Z.; ALTER, H. J.; SHIH, J. W. Modulation of cellular immune response against hepatitis C virus nonstructural protein 3 by cationic liposome encapsulated DNA immunization. **Hepatology**, v. 37, p. 452-460, 2003.

KASPER, L.H.; CURRIE, K.M.; BRADLEY, M.S. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoites antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 134, p. 3436-3451. 1985.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D.P. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu. p. 149-156, 2002.

KIM, S. K.; KARASOV, A.; BOOTHROYD, J. C. Bradyzoite- specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain and host control of parasite replication in the intestine. **Infection and Immunity**, v. 4, p. 1626-1634, 2007.

KIM, H. Y.; KIM, Y. A.; KANG, S.; LEE, H. S.; RHIE, H. G.; AHN, H. J.; NAM, H.

W.; LEE, S. E. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Stray Cats of Gyeonggi-do, Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 46, p. 199-201, 2008.

KOBLANSKY, A. A.; JANKOVIC, D.; OH, H.; HIENY, S.; SUNGNAK, W.; MATHUR, R.; HAYDEN, M. S.; AKIRA, S.; SHER, A.; GHOSH, S. Recognition of profiling by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 1, p. 119-130, 2013.

KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. **Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica**, v. 8, p. 529-542, 2010.

KRAVETZ, J. Congenital Toxoplasmosis. **Clinical Evidence-BMJ**, v. 6, p.906, 2010.

KUWANA, M.; MATSUURA, E.; KOBAYASHI, K.; OKAZAKI, Y.; KABURAKI, J.; IKEDA, Y.; KAWAKAMI, Y. Binding of beta 2-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. **Blood**, v. 105, p. 1552–1557, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 1, p. 49-56, 2011.

LAU, Y. L.; THIRUVENGADAM, G.; LEE, W. W.; FONG, M. Y. Immunogenic characterization of the chimeric surface antigen 1 and 2 (SAG1/2) of *Toxoplasma gondii* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. **Parasitology Research**, v. 3, p. 871-878, 2011.

LEE, Y. H.; SHIN, D. W.; LEE, J. H.; NAM, H. W.; AHN, M. H. Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. **Yonsei Medical Journal**, v. 3, p. 396-404, 2007.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal of Parasitology**, v. 12, p. 1285-1292, 2001.

LEON-PONTE, M.; KIRCHHOF, M. G.; SUN, T.; STEPHENS, T.; SINGH, B.; SANDHU, S.; MADRENAS, J. Polycationic lipids inhibit the pro-inflammatory response to LPS. **Immunology Letters**, v. 1, p. 73-83, 2005.

LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; RISSE, B.; ZAUKE, M.; KLEIN, J. P.; KIEN, T. T. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. **Infection and Immunity**, v. 9, p. 4503-4506, 1998.

LEWDEN, C.; DRABO, Y. J.; ZANNOU, D. M.; MAIGA, M. Y.; MINTA, D. K.; SOW, P. S.; AKAKPO, J.; DABIS, F.; EHOLIÉ, S. P. Disease patterns and causes of death of hospitalized HIV-positive adults in West Africa: a multicountry survey in the

antiretroviral treatment era. **Journal of the International AIDS Society**, v. 7, p. 17-18797, 2014.

LI, Z. Y.; CHEN, J.; PETERSEN, E.; ZHOU, D. H.; HUANG, S. Y.; SONG, H. Q.; ZHU, X. Q. Synergy of mIL-21 and mIL-15 in enhancing DNA vaccine efficacy against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Vaccine**. v. 25:3058-65, 2014.

LIAN, T.; HO, R. J. Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. **Journal of the Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 667-679, 2001.

LIU, Q.; SINGLA, L. D.; ZHOU, H. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: status, challenges and future directions. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, p. 1305-1308, 2012.

LONEZ, C.; VANDENBRANDEN, M.; RUYSSCHAERT, J. M. Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling. **Progress in lipid research**, v. 47, p. 340-347, 2008.

LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**. v. 18, p. 198-201, 2002.

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. 1, p. 41-46, 2009.

MACÊDO-JÚNIOR, A. G.; CUNHA- JÚNIOR, J. P.; CARDOSO, T. H.; SILVA, M. V.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, J. S.; PIROVANI, C. P.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 1-163, 2013.

MACHADO, A. V.; CAETANO, B. C.; BARBOSA, R. P.; SALGADO, A. P.; RABELO, R. H.; GARCIA, C. C.; BRUNA-ROMERO, O.; ESCRIOU, N.; GAZZINELLI, R. T. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. **Vaccine**, v. 18, p. 3247- 3256, 2010.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S. JR.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, 5:e15263, 2010.

MARTIN, V.; SUPANITSKY, A.; ECHEVERRIA, P. C.; LITWIN, S.; TANOS, T.; DE ROODT, A. R.; GUARNERA, E. A.; ANGEL, S. O. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 704-710, 2004.

McLEOD, R.; KIEFFER, F.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; PELLOUX, H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 320-244, 2009.

MENDES, É. A.; FONSECA, F. G.; CASÉRIO, B. M.; COLINA, J. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAETANO, B. C. Recombinant vaccines against *T. gondii*: comparison between homologous and heterologous vaccination protocols using two viral vectors expressing SAG1. **PLoS One**, v. 5:e63201, 2013.

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

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. v. 363. p. 1965-1976, 2004.

NAGEL, S. D.; BOOTHROYD, J. C. The Major Surface Antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* Is Anchored by a Glycolipid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 5569-5574, 1989.

POLLARD, A. M.; ONATOLU, K. N.; HILLER, L.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 103-110, 2008.

RANADE, V. V. Drug delivery systems. 1. site-specific drug delivery using liposomes as carriers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 685-694, 1989.

RAO, M.; ALVING, C.R. Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells. **Advanced drug delivery reviews**, v. 41, p. 171-188, 2000.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, p. 941-945, 2004.

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. 19, p. 2570-2579, 2009.

ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 264-296, 2012.

RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; DEL POZO-RODRÍGUEZ, A.; SOLINÍS, M. Á. Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9:1833-43, 2014.

ROJO-MONTEJO, S.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-MARCOS, S.; PÉREZ-ZABALLOS, F.; LÓPEZ-PÉREZ, I.; PRENAFETA, A.; ORTEGA-MORA, L. M. Comparative efficacy of immunization with inactivated whole tachyzoites versus a tachyzoite-bradyzoite mixture against neosporosis in mice. **Parasitology**, v. 11, p. 1372-1383, 2011.

RONGEN, H. A.; BULT, A.; VAN BENNEKOM, W. P. Liposomes and immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 2, p. 105-133, 1997.

ROSS, D. S.; DONALD, R. G. K.; MORRISSETTE, N. S.; MOULTON, A. L. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Methods Cell Biology**, v. 45, p.27- 63, 1994.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 458–472, 2006.

SA, Q.; WOODWARD, J.; SUZUKI, Y. IL-2 produced by CD8+ immune T cells can augment their IFN-gamma production independently from their proliferation in these secondary response to an intracellular pathogen. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 2199–2207, 2013.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Chorioretinopathy associated with other evidence of cerebral damage in childhood; a syndrome of unknown etiology separable from congenital toxoplasmosis. **Journal of Pediatrics**, v. 35, p. 296–309, 1949.

SANTANA, S. S.; SILVA, D. A.; VAZ, L. D.; PIROVANI, C. P.; BARROS, G. B.; LEMOS, E. M.; DIETZE, R.; MINEO, J. R.; CUNHA-JUNIOR, J. P. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, v. 2, p. 193-201, 2012.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 12, p. 5997-6001, 2002.

SIACHOQUE, H.; GUZMAN, F.; BURGOS, J.; PATARROYO, M. E.; GOMEZ MARIN, J. E. *Toxoplasma gondii*: immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 62-65, 2006.

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. 8, p. 3959-3963, 1998.

STRIEPEN, B.; ZINECKER, C. F.; DAMM, J. B.; MELGERS, P. A.; GERWIG, G. J.; KOOLEN, M.; VLIEGENTHART, J. F.; DUBREMETZ, J. F.; SCHWARZ, R.T. Molecular structure of the "low molecular weight antigen" of *Toxoplasma gondii*: a glucose alpha 1-4 N-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic. **Journal of Molecular Biology**. v. 4, p. 797-813, 1997.

STURGE, C. R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the IFN- $\gamma$  response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, 2014 [Epub ahead of print]

SUPPLY, P.; SUTTON, P.; COUGHLAN, S. N.; BILO, K.; SAMAN, E.; TREES, A. J.; CESBRON DELAUV, M. F.; LOCHT, C. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**. v. 17, p.705-714, 1999.

SZOKA, F. Jr.; PAPAHADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles. **Annual Review of Biophysics & Bioengineering**, v. 9, p. 467- 508, 1980.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**. v. 4851, p. 516-518, 1988.

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 201-210, 2009.

TANAKA, S.; KURODA, Y.; IHARA, F.; NISHIMURA, M.; HIASA, J.; KOJIMA, N.; NISHIKAWA, Y. Vaccination with profilin encapsulated in oligomannose-coated liposomes induces significant protective immunity against *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v. 16, p. 1781-1785, 2014.

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.

TOELLNER, K. M.; LUTHER, S. A.; SZE, D. M.; CHOY, R. K.; TAYLOR, D. R.; MACLENNAN, I. C.; ACHA-ORBEA, H. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 1193-1204, 1998.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 558-561, 2005.

VAN, T. T.; KIM, S. K.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C.; KNOLL, L. J. The BSR4 protein is up-regulated in *Toxoplasma gondii* bradyzoites, however the dominant surface antigenrecognised by the P36 monoclonal antibody is SRS9. **International Journal of Parasitology**, v. 8-9, p. 877-885, 2007.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 70, p. 95-111, 1995.

VERMA, R.; KHANNA, P. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: A global challenge. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 2, p. 291-293, 2013.

WALDELAND, H.; FRENKEL, J. K. Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. **The Journal of Parasitology**, v. 1, p. 60-65, 1983.

WANG, H. L.; PANG, M.; YIN, L. T.; ZHANG, J. H.; MENG, X. L.; YU, B. F.; GUO, R.; BAI, J. Z.; ZHENG, G. P.; YIN, G. R. Intranasal immunisation of the recombinant *Toxoplasma gondii* receptor for activated C kinase 1 partly protects mice against *T. gondii* infection. **Acta Tropica**, v. 9, p. 58-66, 2014.

WANG, Y.; YIN, H. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 7:180, 2014.

WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. **Journal Control Release**, v. 116, p. 255-264, 2006.

WATSON, D. S.; ENDSLEY, A. N.; HUANG, L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. **Vaccine**. v. 13, p. 2256-2272, 2012.

WELTER, A.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; LOURENÇO, E. V.; FERRO, E. A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, N. M. BALB/c mice resistant to *Toxoplasma gondii* infection proved to be highly susceptible when previously infected with Myocoptes musculinus furmites. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 325-335, 2007.

YANG, C. D.; CHANG, G. N.; CHAO, D. Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein rSAG1/2. **Parasitology Research**, v. 1, p. 58-64, 2004.

YAP, G. S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; FERGUSON, D. J. P.; HOWE, D.; SUZUKI, Y.; SHER, A. Partially protective vaccination permits the development of latency in a normally virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4382-4388, 1998.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J. F.; BANNENBERG, G. L.; SERHAN, C. N.; HAYDEN, M. S.; HIENY, S.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; SHER, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 5728, p. 1626-1629, 2005.

YAROVINSKY F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 109-121, 2014.

ZHOU, F.; HUANG, L. Liposome-mediated cytoplasmic delivery of proteins: an effective means of accessing the MHC class I-restricted antigen presentation pathway. **ImmunoMethods**, v. 4, p. 229-235, 1994.

ZOHRA, F. T.; CHOWDHURY, E. H.; AKAIKE, T. High performance mRNA transfection through carbonate apatite-cationic liposome conjugates. **Biomaterials**, v. 30, p. 4006-4013, 2009.