



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunopatologia (IMPAT)

**Mecanismos de proteção induzidos pela imunização com *Tg*HSP70
e de controle da inflamação pelo tratamento com STAg na infecção
por *Toxoplasma gondii***

Paulo Victor Czarnewski Barenco

Uberlândia

27 de Março de 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunopatologia (IMPAT)

**Mecanismos de proteção induzidos pela imunização com TgHSP70
e de controle da inflamação pelo tratamento com STAg na infecção
por *Toxoplasma gondii***

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

Paulo Victor Czarnewski Barenco

Orientadora: Dr^a. Neide Maria da Silva

Uberlândia

27 de Março de 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B248m 2015 Barenco, Paulo Victor Czarnewski, 1991-
Mecanismos de proteção induzidos pela imunização com TgHSP70 e de controle da inflamação pelo tratamento com STAg na infecção por *Toxoplasma gondii* / Paulo Victor Czarnewski Barenco. - 2015.
88 f. : il.

Orientadora: Neide Maria da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Imunização - Teses. 4. Inflamação - Aspectos imunológicos - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Paulo Victor Czarnewski Barenco

“Mecanismos de proteção induzidos pela imunização com TgHSP70 e de controle da inflamação pelo tratamento com STAg na infecção por *Toxoplasma gondii*”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 27 de março de 2015.

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho
FIOCRUZ

Prof. Dr. Oscar Bruna Romero
UFSC

Prof. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso
FMRP/USP

Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM

Prof. Dra. Neide Maria da Silva – orientadora
ICBIM/UFU

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Rosemarie Czarnewski**, por todo apoio durante minha vida. Foi você quem me criou o gosto pelo estudo desde pequeno antes mesmo de entrar na escola. Passando por dificuldade, mas se esforçando para dar o melhor para mim e meu irmão. Obrigado pelo exemplo de ética e honestidade e pelo amor incondicional. Tudo isso resultou no que eu sou hoje. Te amo muito!

PENSAMENTO

“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores tornam-se seu destino.”

Mahatma Gandhi (1869-1948)

AGRADECIMENTOS

À minha família por todos os momentos de descontração e apoio!

À Neide Maria da Silva, uma super “mãe científica” responsável e criteriosa em tudo o que se diz respeito a minha vida profissional. Sempre pensando no melhor para o meu futuro, para que eu um dia pudesse criar asas e seguir meus sonhos.

À você meu sincero Muito Obrigado!

Aos amigos e também colaboradores Eloísa Ferro, Tiago Mineo, José Roberto Mineo, Jair Júnior e Marcelo Barbosa pelas dicas e ensinamentos que me foram de grande valia para o meu desenvolvimento profissional, bem como os momentos de entretenimento.

Aos amigos e colegas de laboratório Ester Cristina, Loyane Bertagnolli, Rosiane Nascimento, Letícia Filice, Mário César, Romulo Souza, Layane Alencar, Marisol Briceño, Wânia Lima, Natália Nogueira e Natália Carnevalhes pelas risadas, pelos momentos de descontração, pela ajuda e pelo grande laço de irmandade que cultivamos. Sempre fomos muito unidos, e assim pretendo que continue...

Aos amigos dos laboratórios vizinhos Angélica Gomes, Bellisa de Freitas, Mariana Bodini, Pâmela Guirelli, Mayara Ribeiro, Priscila Franco, Rafaela, Caroline Motta, Murilo, Tafarel e aos colegas do laboratório de imunoparasitologia pelo convívio agradável de todos os dias!

Ao amigos da genética Patrícia Terra, Paula Souza, Washington e Mayara pela companhia e pelos momentos de aprendizagem.

Aos técnicos do laboratório, Fabrício, Jucélia, Mariane, Maria Lúcia, “Sorriso”, Marcelo, Raimunda e Terezinha pela companhia e dedicação que permitiram o desenvolvimento desse trabalho.

Aos “mais que amigos” Daniel Ferreira e Stephannie Assenheimer pelo apoio e pelos momentos de reflexão que me são de grande valia como ser humano.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro!

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório que apresenta diversos antígenos capazes de modular a resposta imune. Neste trabalho, visamos estudar dois antígenos imunomoduladores através do pré-tratamento para fase aguda e de imunização para fase crônica da infecção. O primeiro objetivo foi estudar o papel do antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) nas células epiteliais para controle da inflamação intestinal durante a infecção aguda por *T. gondii*. Foi demonstrado que o tratamento com STAg preserva o número de células de Paneth durante a infecção, além de manter a integridade e a função do epitélio intestinal. Observamos também que camundongos tratados com STAg produzem IgA secretória contra bactérias patogênicas, controlando a microbiota e diminuindo a inflamação intestinal. Em outra vertente, avaliamos o papel da proteína de choque térmico de 70 kDa de *T. gondii* (TgHSP70) como um antígeno vacinal contra a infecção crônica. Observamos que a imunização com TgHSP70 adsorvida em alúmen reduziu o número de cistos e a inflamação no cérebro de animais infectados, bem como induziu a produção de elevados títulos de anticorpos específicos e imunocomplexos anti-TgHSP70. Mostramos que estes anticorpos não exercem sua função diretamente no parasita, mas parece desenvolver seu papel neutralizando a TgHSP70 livre, a qual induz a produção de óxido nítrico pelas células RAW264.7. Em suma, este trabalho demonstrou os mecanismos de ação de dois antígenos imunomoduladores de *T. gondii*, TgHSP70 e STAg, e reforça o uso destes antígenos como ferramentas para vacinação ou pré-tratamento no controle da infecção e da inflamação intestinal.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, TgHSP70, imunização, STAg, inflamação

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligatory protozoan parasite that present several antigens capable of activating immune responses. In this work, we aimed to study two immunomodulatory antigens in pre-treatment for acute and immunization for chronic infection. The first was to evaluate the role of soluble tachyzoite antigen (STAg) on epithelial cells to control intestinal inflammation during acute infection. It was demonstrated STAg treatment was able to preserve Paneth cell numbers during infection, and to maintain epithelial integrity and function. We also observed that STAg treated and infected C57BL/6 mice produce secretory IgA against pathogenic bacteria, controlling microbiota and diminishing intestinal inflammation. The second objective was to evaluate the role of *T. gondii* heat shock protein of 70 kDa (TgHSP70) as a vaccinal antigen in murine chronic infection. It was observed that immunization with alum-adsorbed TgHSP70 reduced cyst numbers and diminished inflammation in the brain, and also induced high titers of TgHSP70-specific antibodies. We demonstrated that these antibodies do not act directly on the parasite, but seem to neutralize free TgHSP70 that induce nitric oxide production in RAW264.7 cells. In summary, this work demonstrated action mechanisms of two *T. gondii* immunomodulatory antigens, STAg and TgHSP70, and strengthens the use of these antigens as tools for vaccination or pre-treatment in order to control infection and intestinal inflammation.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, TgHSP70, immunization, STAg, inflammation

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 12 |
| 1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose | 12 |
| 1.2. Imunologia e patologia associada à toxoplasmose | 15 |
| CAPÍTULO 1 | 19 |
| 2. INTRODUÇÃO (CAPÍTULO II)..... | 20 |
| 2.1. Doença de Crohn (CD)..... | 20 |
| 3. OBJETIVOS (CAPÍTULO I)..... | 22 |
| 3.1. Geral | 22 |
| 3.2. Específicos..... | 22 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO I) | 23 |
| 4.1. Animais e organismos infecciosos | 23 |
| 4.2. Delineamento experimental do modelo da Doença de Crohn | 23 |
| 4.3. Depleção experimental de células de Paneth com Ditizona (DTZ) | 24 |
| 4.4. Avaliação do parasitismo e da proliferação epitelial por imunohistoquímica | 24 |
| 4.5. Ensaio de permeabilidade epitelial com FITC-dextran | 26 |
| 4.6. Avaliação da expressão gênica e de populações bacterianas por qPCR | 26 |
| 4.7. Quantificação de IgA por ELISA..... | 27 |
| 4.8. Análise estatística | 28 |
| 5. RESULTADOS (CAPÍTULO I) | 29 |
| 5.1. Tratamento com STAg protege contra a depleção de células de Paneth induzida por DTZ | 29 |
| 5.2. O tratamento prévio com STAg não foi capaz de reverter a diminuição da expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) por células de Paneth principalmente em camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i> | 30 |
| 5.3. STAg induz a produção de citocinas reguladoras no íleo de camundongos infectados com <i>T. gondii</i> | 31 |
| 5.4. Tratamento prévio com STAg preserva a função da barreira epitelial intestinal..... | 31 |
| 5.5. STAg previne a desregulação da microbiota em camundongos infectados . | 34 |
| 5.6. STAg aumenta a quantidade de sIgA específica no lúmen intestinal..... | 35 |
| 6. DISCUSSÃO (CAPÍTULO I)..... | 37 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 2 | 42 |
| 7. INTRODUÇÃO (CAPÍTULO II)..... | 43 |
| 7.1. Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSPs) | 43 |
| 7.2. Imunização e vacinas contra toxoplasmose..... | 44 |
| 8. OBJETIVOS (CAPÍTULO II)..... | 47 |
| 8.1. Geral | 47 |
| 8.2. Específicos..... | 47 |
| 9. MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO II) | 48 |
| 9.1. Animais, linhagens celulares e cepas de <i>T. gondii</i> | 48 |
| 9.2. Expressão de <i>TgHSP70</i> em <i>E. coli</i> e purificação por cromatografia..... | 48 |
| 9.3. Imunização de camundongos com proteínas recombinantes | 49 |
| 9.4. Análises histológicas e imunohistoquímicas | 50 |
| 9.5. Quantificação de parasitos no cérebro..... | 50 |
| 9.6. Quantificação de IgG total, IgG1, IgG2a anti- <i>TgHSP70</i> | 51 |
| 9.7. Quantificação de imunocomplexos (ICs) anti- <i>TgHSP70</i> no soro | 52 |
| 9.8. <i>Immunoblotting</i> | 52 |
| 9.9. Análise da proliferação e fenotipagem de células do baço | 53 |
| 9.10. Quantificação de citocinas | 54 |
| 9.11. Ensaio de inibição da infecção e lise mediada por complemento | 54 |
| 9.12. Imunofluorescência | 55 |
| 9.13. Ensaio de inibição da produção de NO | 56 |
| 9.14. Análise estatística | 56 |
| 10. RESULTADOS (CAPÍTULO II) | 57 |
| 10.1. Imunização com <i>TgHSP70</i> promove redução do número de cistos..... | 57 |
| 10.2. Imunização com <i>TgHSP70</i> não altera o perfil de citocinas no soro | 59 |
| 10.3. <i>TgHSP70</i> induz elevada produção de anticorpos | 60 |
| 10.4. <i>TgHSP70</i> ativa e aumenta expressão de CD86 em linfócitos B | 62 |
| 10.5. Anticorpos anti- <i>TgHSP70</i> não exercem função direta no parasita..... | 65 |
| 10.6. Anticorpos anti- <i>TgHSP70</i> previnem a produção de NO induzida por <i>TgHSP70</i> | 66 |
| 11. DISCUSSÃO (CAPÍTULO II)..... | 68 |
| 12. CONCLUSÕES GERAIS | 72 |
| REFERENCIAS..... | 73 |
| ANEXO 1..... | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| AMPs | Peptídeos antimicrobianos |
| BAG | Antígeno de bradizoítas de <i>T. gondii</i> |
| Bmi1 | <i>Polycomb ring finger oncogene 1</i> |
| CD | Doença de Crohn |
| CD3/4/8/19/40/80/86 | <i>Cluster of differentiation 3/4/8/19/40/80/86</i> |
| CPRG | <i>Chlorophenolred-β-D-galactopyranoside</i> |
| d.i. | Dias de infecção |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidina |
| DEFA1/3/5 | α-defensina 1/3/5 |
| DTZ | Ditizona |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| Foxp3 | <i>Forkhead box P3</i> |
| H&E | Hematoxilina e Eosina |
| HSP70 | Proteína de choque térmico de 70 kDa |
| IBD | Doença inflamatória intestinal |
| IC | Imunocomplexo |
| IFNγ | Interferon <i>gamma</i> |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL2/4/6/10/12/17 | Interleucina 2/4/6/10/12/17 |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| kDa | Kilodaltons |
| Lgr5 | <i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i> |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LYZ1 | Lisozima 1 |
| MHC-I/II | Complexo principal de histocompatibilidade I / II |
| MyD88 | Fator 88 de diferenciação mielóide |
| n.i. | Não infectado |
| NK | Célula <i>natural killer</i> |
| NLR | Receptor tipo NOD |
| NO | Óxido nítrico |
| OPD | O-Fenilenodiamina |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PCA | Análise de componente principal |
| PCNA | Antígeno nuclear de proliferação celular |
| qPCR | Reação da cadeia da polimerase quantitativa |
| SAG | Antígeno de superfície de taquizoítas de <i>T. gondii</i> |
| SFB | Soro fetal bovino |
| STAg | Antígeno Solúvel de taquizoítas de <i>T. gondii</i> |
| TGFβ | Fator de crescimento tumoral β |
| T _H 1/2 | Linfócitos T auxiliares do tipo 1/2 |
| TLR2/4 | Receptor do tipo <i>toll</i> 2/4 |
| TMB | <i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i> |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| T _{REG} | Linfócitos T auxiliares do tipo regulador |
| UC | Colite ulcerativa |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Estágios de desenvolvimento de <i>T. gondii</i> . | 13 |
| Figura 2. | Rotas de infecção por <i>T. gondii</i> . | 14 |
| Figura 3. | Resposta celular mediada por IFN γ durante a infecção por <i>T. gondii</i> . | 16 |
| Figura 4. | Mecanismos de eliminação de parasitas mediados por IFN γ em células infectadas. | 17 |
| Figura 5. | Análise da proliferação epitelial intestinal. | 25 |
| Figura 6. | Tratamento com STAg protege contra efeitos deletérios da depleção de células de Paneth durante a infecção por <i>T. gondii</i> . | 29 |
| Figura 7. | O tratamento com STAg não mantém totalmente a função das células de Paneth, mas induz resposta reguladora. | 32 |
| Figura 8. | O tratamento com STAg protege a barreira epitelial intestinal pelo aumento da proliferação através da expressão de <i>bmi1</i> . | 33 |
| Figura 9. | Tratamento com STAg previne disbiose em camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i> . | 34 |
| Figura 10. | Tratamento com STAg induz a produção de sIgA anti- <i>E. coli</i> . | 36 |
| Figura 11. | Efeitos do tratamento com STAg na modulação da resposta imune intestinal. | 40 |
| Figura 12. | Imunização com <i>TgHSP70</i> promove redução do número de cistos cerebrais. | 58 |
| Figura 13. | Imunização com <i>TgHSP70</i> não induz alteração do perfil de citocinas no soro de animais desafiados com <i>T. gondii</i> . | 60 |
| Figura 14. | Imunização com <i>TgHSP70</i> induz maior produção de anticorpos anti-STAg. | 61 |
| Figura 15. | <i>TgHSP70</i> estimula a proliferação de linfócitos B mediada pela molécula co-estimuladora CD86. | 63 |
| Figura 16. | <i>TgHSP70</i> não estimula a proliferação de linfócitos T. | 64 |
| Figura 17. | Anticorpos anti- <i>TgHSP70</i> não inibem ou promovem lise mediada pelo complemento através da ligação direta ao parasita. | 66 |
| Figura 18. | Anticorpos anti- <i>TgHSP70</i> previnem a ativação de macrófagos por <i>TgHSP70</i> . | 67 |
| Figura 19. | Imunização com <i>TgHSP70</i> reduz a produção de NO em macrófagos induzida por <i>TgHSP70</i> . | 71 |
| Tabela 1. | Lista das sequências de primers utilizados para quantificação de mRNA em amostra de íleo de camundongos. | 27 |
| Tabela 2. | Lista das sequências de <i>primers</i> utilizados para quantificação de populações microbianas por qPCR. | 27 |
| Tabela 3. | Grupos experimentais que foram utilizados para avaliação do potencial imunogênico da proteína <i>TgHSP70</i> adsovida com alumínio. | 50 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

T. gondii é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório de células nucleadas de humanos e outros animais homeotermos, dentre eles aves e mamíferos (DUBEY, 2010). A toxoplasmose é uma doença de distribuição cosmopolita (JONES; DUBEY, 2010) e uma das zoonoses causadas por parasitas mais comuns no mundo (SROKA; WOJCIK-FATLA; DUTKIEWICZ, 2006). Estima-se que cerca de 1/3 da população adulta mundial esteja infectada pelo parasita. Devido à falta de uma vacina eficaz em humanos, a prevenção da transmissão se mostra o melhor meio de prevenção da toxoplasmose, devendo ser feita através da redução da exposição a oocistos, presentes na água e/ou no solo contaminados com fezes de felídeos infectados; e a cistos teciduais, encontrados em carne crua de animais frequentemente utilizados na alimentação humana, como suínos e carneiros (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ELMORE *et al.*, 2010).

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

A toxoplasmose apresenta alta prevalência sorológica em mulheres gestantes em todo o mundo, tanto em países como a França (54,3%), Suíça (46,1) e Alemanha (63,2%) (ELSHEIKHA, 2008), quanto no Brasil (72%) (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; GROSS, 2004). A transmissão vertical pode ocorrer em gestantes imunocompetentes que se infectarem durante a gestação. Em pacientes gestantes infectadas com *T. gondii*, estima-se que 45% dos fetos tornam-se infectados e que cerca de 6% destes morrem, enquanto 10-30% desenvolvem sintomas como hidrocefalia, calcificação intracerebral, coriorretinite e retardo mental (ROBERTS; BREWER; ALEXANDER, 1994).

T. gondii apresenta três estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida (Figura 1): (1) os taquizoítas são predominantes na fase aguda da toxoplasmose e reproduzem-se rapidamente dentro estruturas conhecidas como vacúolos parasitóforos; (2) os bradizoítas são predominantes durante a fase crônica da infecção e formam estruturas císticas no interior de células do hospedeiro e; (3) os esporozoítas são encontrados dentro de oocistos oriundos da reprodução sexuada no intestino de Felídeos e liberados nas fezes (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

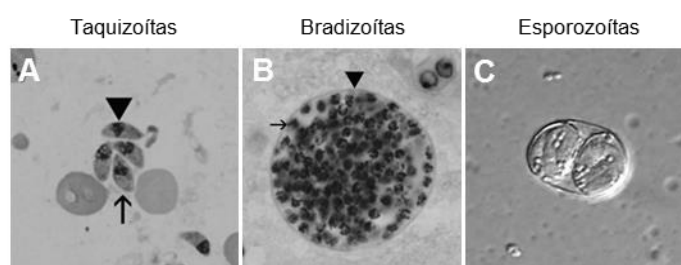


Figura 1. Estágios de desenvolvimento de *T. gondii*. **(A)** Quatro taquizoítas livres. A seta aponta um taquizoíta e a cabeça de seta indica o núcleo. **(B)** Vários bradizoítas dentro de um cisto tecidual. A seta aponta um bradizoíta e a cabeça de seta indica a parede cística. **(C)** Oito esporozoítas contidos dentro de dois esporocistos formando 1 oocisto esporulado. Reproduzido (WEISS; KIM, 2007).

T. gondii apresenta um ciclo de vida constituído de várias formas infecciosas (Figura 2). A fase sexuada ocorre no intestino de hospedeiros definitivos (Felidae) (ELMORE *et al.*, 2010). Após a ingestão de cistos teciduais, a parede cística é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino, liberando formas bradizoítas capazes de penetrar nas células epiteliais do intestino e iniciarem o desenvolvimento de numerosas gerações sexuadas. No intestino desenvolvem-se

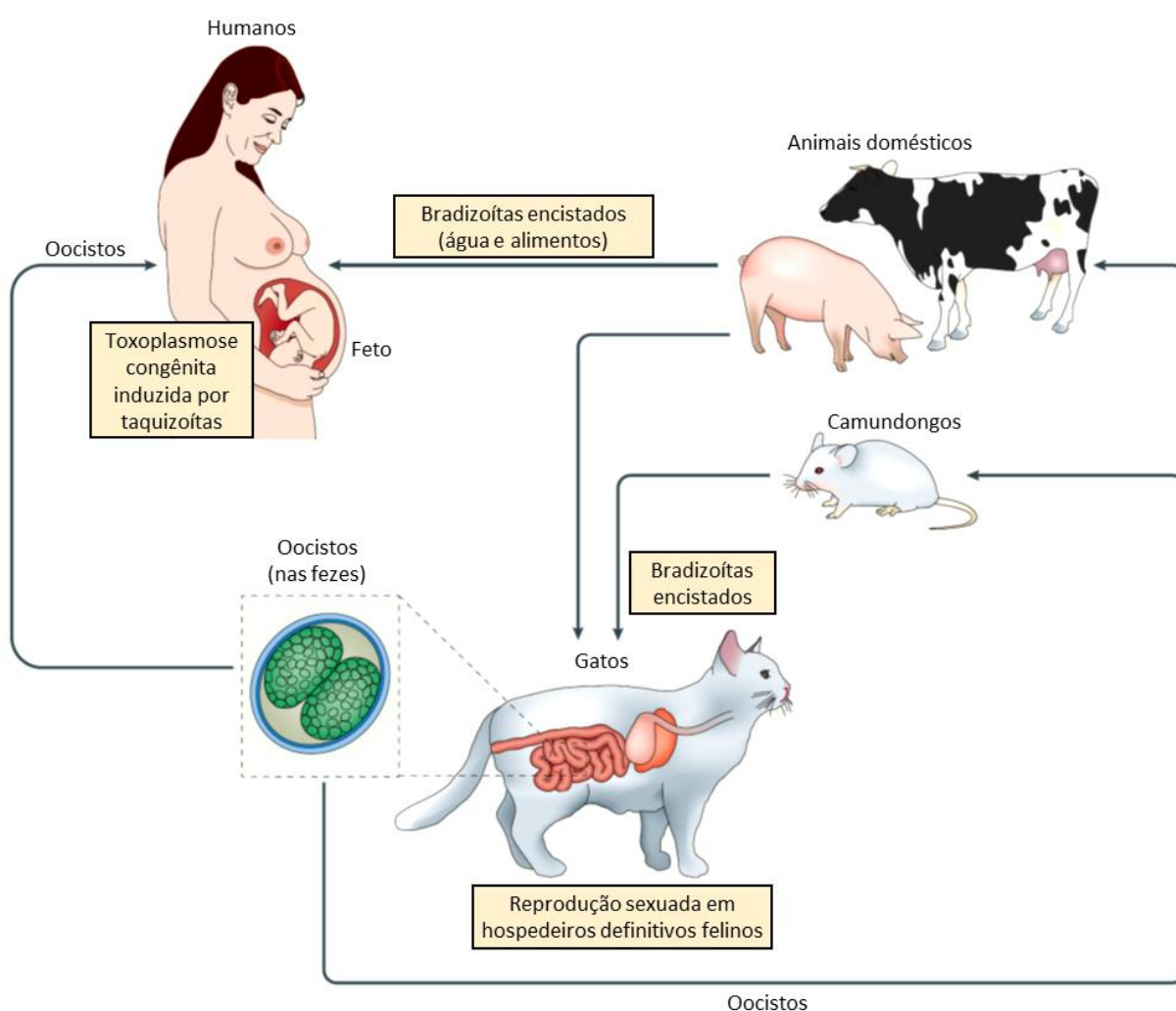


Figura 2. Rotas de infecção por *T. gondii*. A transmissão de *T. gondii* acontece por três principais vias: (1) transmissão pela ingestão de oocistos esporulados liberados nas fezes de felídeos (hospedeiros definitivos); (2) transmissão de animais para humanos (zoonótica) pela ingestão de carne e/ou alimentos contaminados com cistos teciduais e; (3) transmissão da mãe para a criança (congênita) através da passagem de taquizoítas pela barreira placentária. Reproduzido com permissão (YAROVINSKY, 2014).

cinco tipos morfológicos denominadas tipo A a E. Quando a fecundação ocorre, é formado o oocisto contendo dois esporocistos, que por sua vez contém quatro esporozoítas cada (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). A fase assexuada ocorre em hospedeiros intermediários endotérmicos, como aves e mamíferos, e é constituída de parasitas intracelulares na forma de taquizoítas. Esta forma pode infectar e se multiplicar em células nucleadas do hospedeiro, propagando-se por todo o corpo e levando o desenvolvimento da fase aguda da infecção (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

1.2. Imunologia e patologia associada à toxoplasmose

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

A ativação da resposta imune inata contra *T. gondii* é desencadeada principalmente por receptores de reconhecimento padrão, como os receptores semelhantes à toll (TLRs) (PIFER; YAROVINSKY, 2011). A deficiência de TLR4 está envolvida com a redução da produção de interleucina 6 (IL6), interferon *gamma* (IFN γ) e IL12, promovendo o aumento da carga parasitária no SNC (FURUTA *et al.*,

2006). Além dos neutrófilos e macrófagos, as células dendríticas também são capazes de produzir IL-12, a qual estimula a produção de IFN γ pelos linfócitos NK (Figura 3) (RACHINEL *et al.*, 2004). Além disso, recentemente foi mostrado que a proteína profilina de *T. gondii* é capaz ativar TLR11 e 12 e induzir a produção de IL12 pelas células dendríticas (Figura 3) (KOBANSKY *et al.*, 2013).

T. gondii possui mecanismos capazes de evadir da resposta imune e reduzir a sinalização via IFN γ através da molécula supressora de sinalização de citocinas 1 (STUTZ *et al.*, 2012). Quando ativados, macrófagos produzem TNF, que juntamente com IFN γ produzido por células T CD4⁺ da lâmina própria, amplificam a produção da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) (LIESENFELD *et al.*, 1999). Os macrófagos

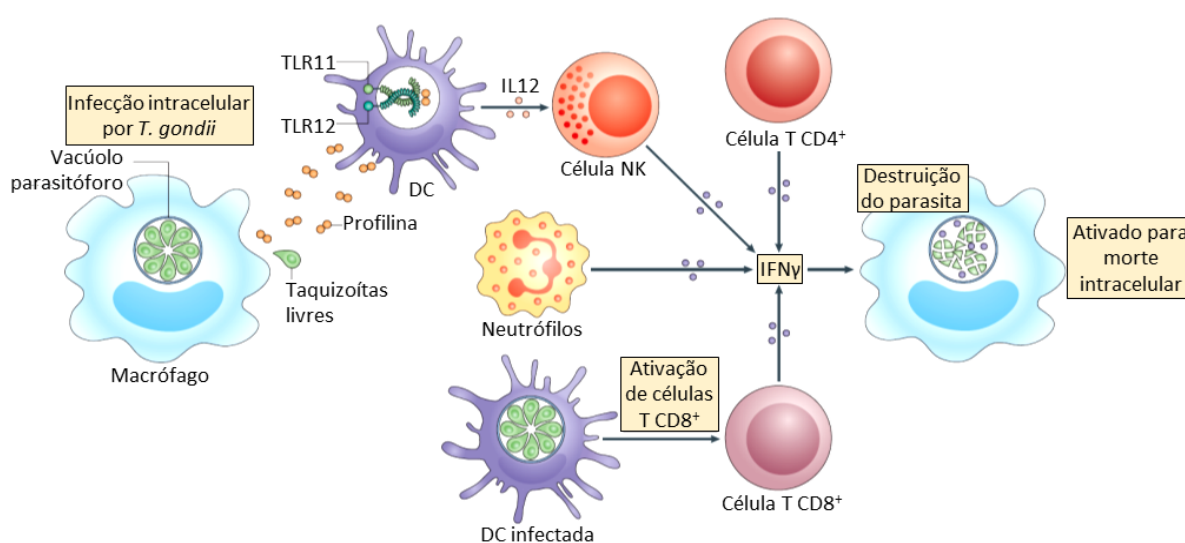


Figura 3. Resposta celular mediada por IFN γ durante a infecção por *T. gondii*. IFN γ é essencial para a sobrevivência durante a infecção por *T. gondii*. A ativação de células dendríticas (DCs) mediada por moléculas secretadas (Ex.: profilina) ou pela infecção intracelular promovem a produção de IL12, a qual estimula a produção de IFN γ pelas células NK. As DCs infectadas também são capazes de ativar as células T CD8⁺, as quais também servem como fonte de IFN γ , em adição a produção pelas células T CD4⁺ e pelos neutrófilos. IFN γ é fundamental para a completa ativação de mecanismos de inibição e destruição de parasitas intracelulares em macrófagos. Reproduzido de (YAROVINSKY, 2014).

são a principal fonte de óxido nítrico (NO) para destruição de parasitas (Figura 4), especialmente durante a fase aguda, embora os elevados níveis de NO mediam a inflamação intestinal (KHAN *et al.*, 1997). Durante a fase crônica no cérebro, várias células iNOS⁺ são encontradas ao redor de cistos teciduais de *T. gondii*, sugerindo um papel destas células para o controle da infecção crônica (SCHLUTER *et al.*, 1999). Além disso, a inibição não específica de iNOS leva ao aumento do número de cistos cerebrais em camundongos C57BL/6 (KANG, K. M. *et al.*, 2004). Porém, uma

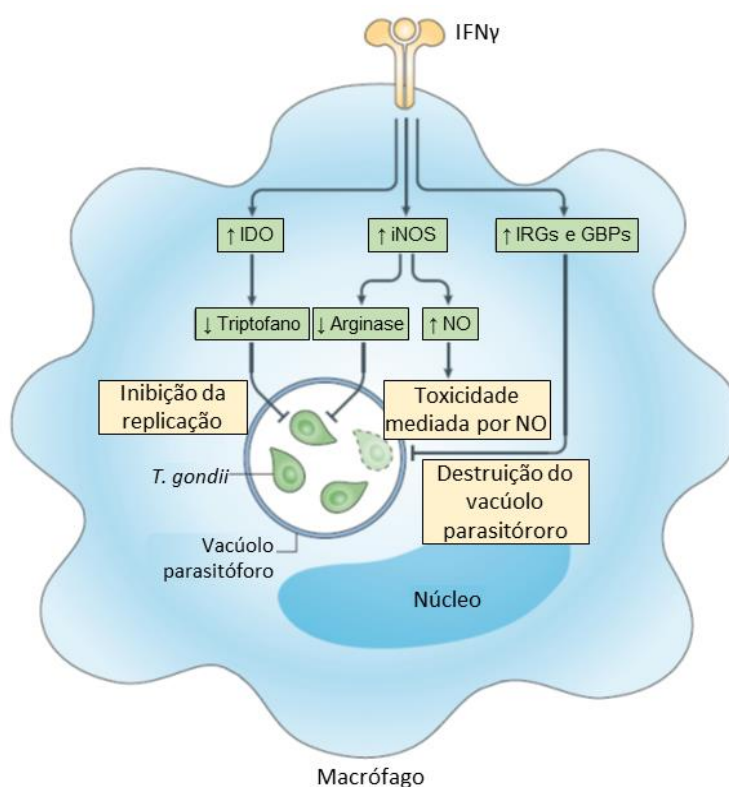


Figura 4. Mecanismos de eliminação de parasitas mediados por IFN γ em células infectadas. IFN γ possui diversos efeitos em mecanismos celulares para o combate a parasitas intracelulares. Dentre eles estão: (1) aumento da expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e da consequente redução da disponibilidade de triptofano, o qual é um aminoácido essencial para a replicação do parasita; (2) aumento da expressão de iNOS que aumenta os níveis de NO, o qual é uma molécula tóxica para o parasita, e diminui os níveis de arginase, regulando a replicação intracelular e (3) aumento de GTPases relacionadas com a imunidade (IRGs) e proteínas ligantes de guanilato (GBPs) que mediam a destruição do vacúolo parasitóforo. Reproduzido de (YAROVINSKY, 2014).

produção exagerada de óxido nítrico (NO), IFN γ e TNF contribuem para a inflamação e até necrose no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados e, se não controlada, essa resposta pode levar à morte (KHAN *et al.*, 1997; LIESENFELD *et al.*, 1999).

A resposta imune adaptativa contra *T. gondii* é formada através da apresentação de antígenos pelo complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) de células dendríticas e macrófagos e MHC-I de células nucleadas. As duas principais populações de células T ativadas por este mecanismo são os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Porém, o principal papel das células T CD4⁺ na infecção é como células auxiliares das células T CD8⁺ (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Os infiltrados celulares relacionados com a encefalite toxoplásmica no SNC de camundongos adultos são compostos por macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (DECKERT-SCHLUTER *et al.*, 1994). Porém, a falta de mecanismos reguladores eficazes da resposta contra o parasita pode levar a quadros imunopatológicos graves (GAZZINELLI *et al.*, 1996).

A resposta humoral adaptativa contra *T. gondii* é desencadeada pelas células B, as quais desempenham um papel importante para controle de cistos teciduais de *T. gondii* tanto em camundongos tipo selvagem (WT) ou deficientes em CD4 (KANG; REMINGTON; SUZUKI, 2000; JOHNSON; SAYLES, 2002). Além disso, estas células também são essenciais para a geração de respostas imunes mediadas por anticorpo em camundongos imunizados e controlando a replicação do parasita (SAYLES; GIBSON; JOHNSON, 2000).

CAPÍTULO 1

Antígeno Solúvel de Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* preserva células de Paneth e previne disbiose em infecção oral

2. INTRODUÇÃO (CAPÍTULO II)

2.1. Doença de Crohn (CD)

As doenças inflamatórias intestinais (IBD) são processos inflamatórios crônicos que ocorrem no intestino e apresentam duas formas clínicas distintas, a doença de Crohn (CD) e a colite ulcerativa (UC), as quais afetam o trato gastrointestinal e o intestino grosso, respectivamente (KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010). A patogênese da CD é causada pela combinação de vários fatores incluindo desordens genéticas, disbiose da microbiota intestinal, anormalidades na barreira epitelial intestinal e disfunção das respostas inflamatórias (XAVIER; PODOLSKY, 2007). Uma vez que os processos inflamatórios na CD e na fase aguda da infecção oral de camundongos C57BL/6 por *T. gondii* são similares, a toxoplasmose aguda intestinal nessa linhagem de camundongos é um modelo de estudo de mecanismos imunes no desenvolvimento de CD (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012). *T. gondii* infecta a mucosa através da invasão direta das células epiteliais no intestino delgado e rapidamente iniciam processos inflamatórios na mucosa (JU; CHOCKALINGAM; LEIFER, 2009).

A defesa das superfícies de mucosas incluem a secreção de IgA, defensinas, citocinas e quimiocinas (JU; CHOCKALINGAM; LEIFER, 2009). A IgA secretória é a primeira linha de defesa contra patógenos entéricos, além de ser responsável por controlar comunidades bacterianas com a finalidade de manter a homeostase intestinal (KATO *et al.*, 2014). A IgA é produzida pelas células B nos órgãos linfoides intestinais e passam através do epitélio para o lúmen, promovendo a neutralização de patógenos e controlando bactérias comensais (SANTAOLALLA; ABREU, 2012). Além disso, o epitélio intestinal protege o hospedeiro contra a infecção microbiana pela formação de uma barreira física, além de participar na resposta imune inata

pela produção de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (MULLER; AUTENRIETH; PESCHEL, 2005). Existem duas populações de células tronco intestinais bem caracterizadas e funcionalmente distintas, localizadas nas criptas e que são caracterizadas pelos marcadores específicos Bmi1 e Lgr5, as quais são responsáveis pela proliferação epitelial intestinal (YAN *et al.*, 2012). As células de Paneth, encontradas na base das criptas dos vilos, secretam peptídeos antimicrobianos (cathecidas e defensinas) que são importantes para o controle de bactérias intestinais através de diversos mecanismos de desestabilização da membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (OUELLETTE, 2011).

Vários estudos tem demonstrado o papel do STAg na regulação de respostas imunes. A injeção prévia com antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) 24 horas antes do desafio com *T. gondii* protegeu camundongos deficientes em IL10 (REIS E SOUSA *et al.*, 1997). Além disso, o tratamento com STAg 4 dias antes do transplante alográfico de pele e de coração aumentou a sobrevivência e reduziu o número de células CD4⁺ e CD8⁺ nos órgãos de camundongos C57BL/6 (WANG *et al.*, 2013). Recentemente, nosso grupo verificou que o tratamento com STAg 48 horas antes da infecção protegeu camundongos C57BL/6 contra inflamação intestinal durante a infecção oral por *T. gondii* pela redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias (BENEVIDES *et al.*, 2013). Como os mecanismos desenvolvidos pelo tratamento com STAg ainda não estão totalmente definidos, verificamos os efeitos de STAg nas células epiteliais intestinais e na microbiota que poderiam estar envolvidas nesta proteção.

3. OBJETIVOS (CAPÍTULO I)

3.1. Geral

Avaliar os mecanismos envolvidos na proteção do pré-tratamento com STAg contra inflamação intestinal em camundongos induzida pela infecção oral com *T. gondii*.

3.2. Específicos

- Analisar a expressão de citocinas no intestino delgado de animais infectados e tratados com STAg;
- Avaliar o papel do STAg nas células de Paneth e na produção de peptídeos antimicrobianos para controle da infecção e da inflamação em camundongos infectados;
- Avaliar o papel do STAg na proliferação e na função da barreira epitelial intestinal, bem como a contribuição das células tronco epiteliais Bmi1⁺ e Lgr5⁺;
- Avaliar a composição da microbiota em camundongos infectados e tratados com STAg;
- Avaliar o papel do STAg na produção de IgA específica no soro ou no lúmen intestinal.

4. MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO I)

4.1. Animais e organismos infecciosos

Camundongos BALB/c, C57BL/6, CB10-H2 e C57BL/KsJ fêmeas com 8 a 12 semanas de idade foram mantidos como colônias homozigóticas separadamente no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob condições de disposição de ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos e procedimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU, com número de protocolo 120/10.

A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em cérebro de roedores da espécie *Calomys callosus* como previamente descrito (BARBOSA *et al.*, 2007). Os cistos foram isolados do cérebro e utilizados para infecção dos animais experimentais.

4.2. Delineamento experimental do modelo da Doença de Crohn

O antígeno solúvel de taquizoítas foi preparado como previamente descrito (GAZZINELLI *et al.*, 1991; BENEVIDES *et al.*, 2013; BARENCO *et al.*, 2014). Camundongos C57BL/6, BALB/c, CB10-H2 e C57BL/KsJ foram injetados com 25 µg/animal de STAg e, 48 horas depois, infectados oralmente com 30 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*. Um grupo (PBS) de animais foi injetado somente com o veículo e infectado, e outro grupo (N.I.) controle não foi infectado nem tratado. Os camundongos foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical após 8 dias de infecção (d.i.). Amostras de tecido foram fixadas em formalina tamponada 10%, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo. As secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e analisada como previamente descrito (SILVA *et al.*, 2009). O escore inflamatório no intestino delgado é representado como unidades

arbitrárias como sendo: 0-2, suave; 2,1-4, moderado; 4,1-6, grave; e acima de 6, muito grave. Todas as análises foram feitas com a objetiva de 40x de aumento em ensaio duplo cego de duas secções histológicas por animal.

4.3. Depleção experimental de células de Paneth com Ditizona (DTZ)

A ditizona é uma molécula quelante de metal capaz de matar seletivamente as células de Paneth (SAWADA *et al.*, 1991) e foi preparada como previamente descrito (SHERMAN *et al.*, 2005). Brevemente, a DTZ (Sigma) foi diluída em solução de Li_2CO_3 25 mM pH 11,2 e incubado por 2 horas a 37°C sob agitação. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com STAg 48 horas antes da infecção e adicionalmente, injetados por via intraperitoneal (i.p.) com 0,2 mL de DTZ (75 mg/Kg para BALB/c e 19 mg/Kg para C57BL/6) ou Li_2CO_3 6 horas antes da infecção. Como controle, camundongos foram tratados com DTZ ou Li_2CO_3 , mas não foram infectados. Todos os grupos foram injetados diariamente com DTZ ou Li_2CO_3 até os 8 d.i., quando eles foram sacrificados para coleta dos órgãos e processamento como supracitado.

4.4. Avaliação do parasitismo e da proliferação epitelial por imunohistoquímica

A proliferação epitelial intestinal foi avaliada pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). As análises de parasitismo foram feitas nos órgão como previamente descrito (SILVA *et al.*, 2010; BARENCO *et al.*, 2014). Resumidamente, secções teciduais do intestino foram bloqueadas com H_2O_2 3% por 30 minutos, e submetidas a recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 no micro-ondas por 7 minutos. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite

desnatado (Molico, Nestlé) por 30 minutos, e os cortes incubados com anticorpo monoclonal anti-PCNA (Novocastra) ou com antisoro de *C. callosus* anti-*T. gondii* (produzido em nosso laboratório) diluídos em saponina 0,01%. Após incubação com anticorpo biotinilado anti-IgG de camundongo (Sigma), a reação foi amplificada com complexo avidina-biotina (ABC kit; Vector). A reação foi revelada com DAB (Sigma) e as secções contracoradas com Hematoxilina e examinadas em microscópio óptico usando aumento de 40x. Os núcleos marcados em castanho da reação de PCNA foram avaliados de acordo com a frequência e a posição em que estes núcleos se encontravam no vilo intestinal (Figura 13).

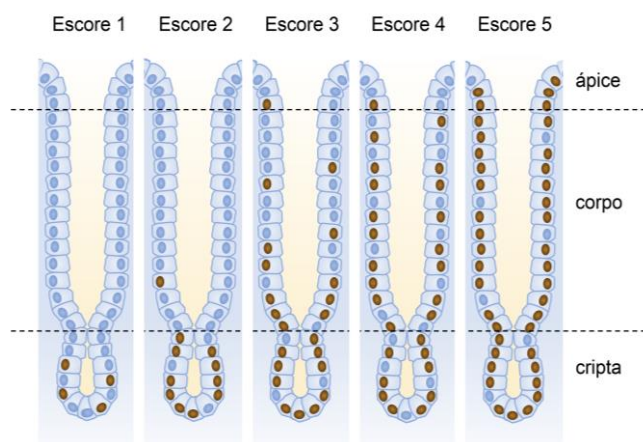


Figura 5. Análise da proliferação epitelial intestinal. Secções teciduais intestinais submetidas a marcação para PCNA por imunohistoquímica foram analisadas de acordo com a frequência e a localização das células epiteliais PCNA⁺. **Escore 1**, poucas células restritas nas criptas. **Escore 2**, muitas células localizadas principalmente nas criptas. **Escores 3-5** apresentam muitas células nas criptas. **Escore 3**, poucas células principalmente na base do corpo do vilão. **Escore 4**, muitas células positivas ao longo do corpo do vilão. **Escore 5**, quase todas as células epiteliais são positivas e estão distribuídas desde as criptas até a ponta dos vilos.

4.5. Ensaio de permeabilidade epitelial com FITC-dextran

Determinação da permeabilidade intestinal foi feita com camundongos C57BL/6 infectados e tratados previamente com PBS ou STAg. Após 8 d.i., os animais foram inoculados com 10 mg de FITC-dextran 4 kDa (Sigma) por gavagem (BRANDL *et al.*, 2009). Três horas depois, o soro foi coletado para determinação da fluorescência usando SpectraMax 2 (molecular Devices). As concentrações de FITC-dextran foram determinadas por interpolação na curva padrão.

4.6. Avaliação da expressão gênica e de populações bacterianas por qPCR

O RNA total de amostras do intestino delgado foi extraído usando Trizol (Life Technologies) e foi utilizado para síntese de cDNA (utilizando reagentes da Promega) de acordo com as instruções dos fabricantes. As reações de qPCR foram realizadas no aparelho ABI7500 usando SYBR Green (Life Technologies). As ciclagens foram realizadas a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60 °C (1 min), utilizando *primers* específicos (Tabela 2). Os dados foram analisados em relação ao gene GAPDH usando o método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para quantificação das populações bacterianas, o DNA genômico foi extraído do conteúdo intestinal (intestino delgado) usando QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen). A quantificação relativa foi realizada utilizando SYBR Green (Life Technologies) e *primers* específicos para cada população bacteriana e para o locus gênico universal do rRNA 16S (Tabela 3). As condições de ciclagem foram feitas a 95 °C por 10 min e 40 ciclos a 95 °C (15 s), 50 °C (1 min) e 60 °C (1min). A análise de componente principal (PCA) foi realizada em linguagem R (RStudio) utilizando os dados de qPCR transformados para logarítmico e depois normalizados pela amplitude (VAN DEN BERG *et al.*, 2006).

Tabela 1. Lista das sequências de primers utilizados para quantificação de mRNA em amostra de íleo de camundongos.

| Gene | Sequências (5'→3') | Referência* |
|--------------|---|--------------------------------|
| <i>gapdh</i> | GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG CAGTGTAGCCCAAGATGCC | (BARENCO <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>defa1</i> | TCAAGAGGCTGCAAAGGAAGAGAAC CGACAGCGACTTGTACCTCTGGT | (RAETZ <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>defa3</i> | CAGGCTGTGTCTGTCTCTTTTG TCAGCGACAGCAGAGTGTGA | (FOUREAU <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>defa5</i> | TTGTCCTCCTCTCTGCCCTTGT ATGAAGAGCAGACCCTTCTTGG | (FOUREAU <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>lyz</i> | GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG | (RAETZ <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>il10</i> | TTTAAGGGTACTTGGGTTGCC CGCATCCTGAGGGTCTTCA | (BARENCO <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>il12</i> | GGAAGCACGGCAGCAGAAT TGGTTTGATGATGTCCCTGATG | (BARENCO <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>ifng</i> | GGCTGTTTCTGGCTGTTACTGC CATCCTTTTGCCAGTTCCTCC | (BARENCO <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>foxp3</i> | AGAATGCCATCCGCCACA CACACTGCTCCCTTCTCGCT | |
| <i>tnf</i> | CCACCACGCTCTTCTGTCTACTG GATCTGAGTGTGAGGGTCTGGG | (BARENCO <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>bmi1</i> | AGCAGCAATGACTGTGATGCACTTGAG GCTCTCCAGCATTTCGTCAGTCCATCCC | (PARK <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>lgr5</i> | GGGCAGCACTTTTCAGCAG CCAACCTTATTAGAGACGGCAACG | |

* Os primers não referenciados foram desenhados utilizando o programa Primer Express v3 (Life Technologies).

Tabela 2. Lista das sequências de *primers* utilizados para quantificação de populações microbianas por qPCR.

| Táxon Bacteriano | Sequências (5'→3') | Referência |
|--------------------|--|-------------------------------|
| 16S rRNA universal | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG | (GUO <i>et al.</i> , 2008) |
| Bacteriodetes | CRAACAGGATTAGATACCCT GGTAAGGTTCCCTCGCGTAT | (GUO <i>et al.</i> , 2008) |
| Enterobacteriaceae | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG | (BARMAN <i>et al.</i> , 2008) |
| Firmicutes | GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC | (GUO <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>E. coli</i> | AAGACGTATTCTCCATCTCCGG ACGGCCGCCTTCATCTTTGGACAG | (JIANG <i>et al.</i> , 2013) |

* Todas as sequências estão no sentido 5'→3'.

4.7. Quantificação de IgA por ELISA

Para quantificação de IgA no soro, placas de baixa afinidade (Kartell) foram cobertas com 10 µg/mL de STAg (50 µL/poço) a 4 °C por 16 horas. As placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com soro dos camundongos (1:64) diluídos em PBS-TM 1% (50 µL/poço) a 37 °C por 1 hora. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgA de camundongo (Santa Cruz) diluído 1:2000 em PBS-TM 1% (50 µL/poço) por 1 hora a 37° C. A reação foi revelada com OPD 0,5 mg/mL e a absorbância foi avaliada em leitora de ELISA (Molecular Devices) a 492 nm.

A quantificação de IgA secretada (sIgA) foi realizada como previamente descrito com modificações (FREHN *et al.*, 2014). Brevemente, placas de alta afinidade (Costar-Corning) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de STAg ou de extrato de *E. coli* (50 µL/poço) a 4 °C por 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com BSA 5% em PBS-T por 1 hora, lavadas e incubadas com o conteúdo intestinal solúvel (1:7) a 4 °C por 16 horas. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase anti-IgA (Santa Cruz) a diluído 1:2000 a 37 °C por 2 horas (50 µL/poço). A reação foi revelada com OPD 0,5 mg/mL e lida em leitora de ELISA (Molecular Devices) a 492 nm.

4.8. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software). Os grupos foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) e analisados pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, pelo teste *t* não-pareado ou pelo teste Mann-Whitney, quando apropriados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS (CAPÍTULO I)

5.1. Tratamento com STAg protege contra a depleção de células de Paneth induzida por DTZ

Como anteriormente verificado (SOUSA, 2013) o tratamento com STAg foi capaz de preservar o número de células de Paneth em camundongos infectados. Assim, verificamos o papel do tratamento com STAg no modelo de depleção de células de Paneth com DTZ na infecção por *T. gondii*. Foi observado que camundongos BALB/c tratados com DTZ e infectados apresentaram redução do comprimento intestinal (Figura 14A). O tratamento com STAg reduziu a inflamação intestinal nas duas linhagens de camundongo, independente da depleção das

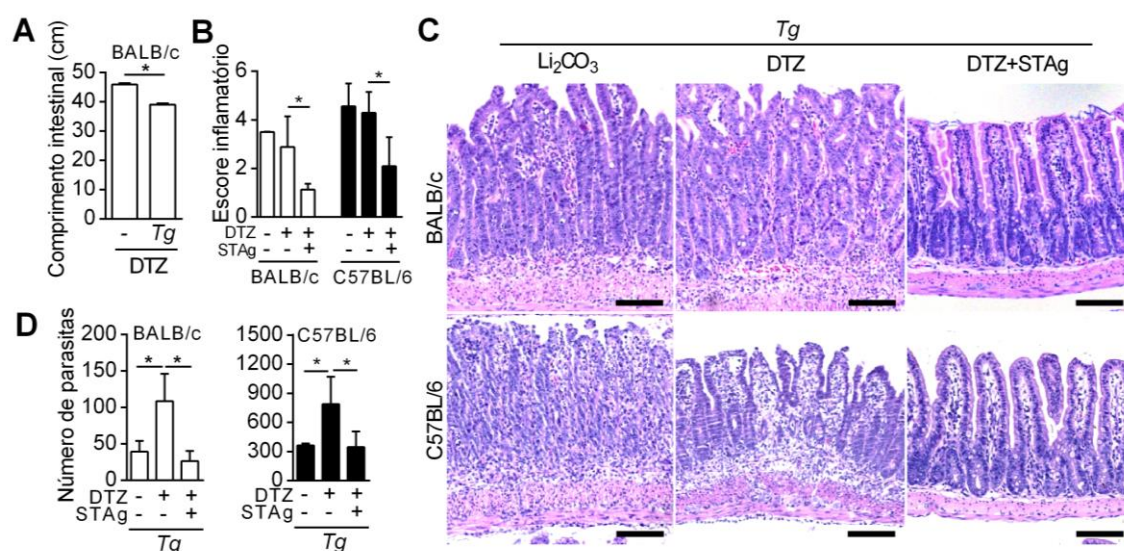


Figure 6. Tratamento com STAg protege contra efeitos deletérios da depleção de células de Paneth durante a infecção por *T. gondii*. Camundongos foram tratados com DTZ para depleção específica das células de Paneth durante a infecção por *T. gondii*. (A) Comprimento intestinal de camundongos BALB/c tratados com DTZ. Fotomicrografias representativas da inflamação intestinal (B) e escore inflamatório intestinal nas duas linhagens de camundongo (C). Barras representam 100 μ m. (D) Quantificação de parasitas no intestino de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (n=3). N.I., não infectado. Tg, grupos infectados com *T. gondii*. *Teste *t* não-pareado ou teste Mann-Whitney (escore inflamatório em B), P<0,05.

células de Paneth com DTZ (Figura 14, B e C). A depleção das células de Paneth com DTZ aumentou significativamente o número de parasitas presentes no intestino, o qual foi diminuído em camundongos infectados e tratados previamente com STAg. Este efeito também foi observado na linhagem C57BL/6, na qual o tratamento com STAg diminuiu o número de parasitas, independente do tratamento com DTZ (Figura 14D). Estes resultados mostram que as células de Paneth são importantes no controle do número de parasitas no intestino delgado e que o tratamento com STAg foi capaz de proteger os animais mesmo sob depleção das células de Paneth.

5.2. O tratamento prévio com STAg não foi capaz de reverter a diminuição da expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) por células de Paneth principalmente em camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*

O alelo “d” do MHC-I é um importante fator de resistência ao desenvolvimento de quadros patológicos no intestino de camundongos infectados com a cepa P-Br (FUX *et al.*, 2003). Como verificado em camundongos BALB/c (H-2^d) e C57BL/6 (H-2^b) (SOUSA, 2013), observamos que camundongos congênicos CB10-H2 (H-2^b) e C57BL/KsJ (H-2^d) também apresentaram redução do número de células de Paneth os 8 dias de infecção (Figura 15, A e B). Estes dados demonstram que a infecção reduz o número de células de Paneth independente do background genético e do MHC-I. Porém, apesar do tratamento com STAg ser capaz de manter o número de células de Paneth durante a infecção (SOUSA, 2013), ele não foi capaz de manter os níveis de expressão de AMPs, incluindo *defa1*, *defa3*, *defa5*, com exceção de lisozima (*lyz1*) cuja expressão foi mantida somente em camundongos BALB/c tratados com STAg (Figura 15C). Estes dados sugerem que o tratamento com STAg

foi capaz de preservar, em parte, a função das células de Paneth em camundongos BALB/c, mas não em C57BL/6.

5.3. STAg induz a produção de citocinas reguladoras no íleo de camundongos infectados com *T. gondii*

Estudos anteriores mostraram que STAg é capaz de modular a produção de citocinas (BENEVIDES *et al.*, 2013) e de reduzir as alterações histológicas nos órgãos periféricos e no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados (BENEVIDES *et al.*, 2013; SOUSA, 2013). Foi observado que o tratamento com STAg antes da infecção foi capaz de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como *ifng*, *il12* e *tnf* quando comparado com camundongos C57BL/6 infectados não tratados (Figura 15D). Além disso, observou-se também o aumento da expressão da citocina reguladora *il10* e do fator de transcrição *foxp3* (Figura 15D), as quais estão intimamente relacionadas com a indução de células T reguladoras (T_{REG}) (YAN *et al.*, 2012).

5.4. Tratamento prévio com STAg preserva a função da barreira epitelial intestinal

A proliferação das células epiteliais é um fator chave para a manutenção da homeostase intestinal em resposta a processos inflamatórios, como a IBD (KOCH; NUSRAT, 2012) e a infecção por *T. gondii*. Assim, perguntamos se o tratamento com STAg poderia estar mantendo a integridade epitelial através do aumento da proliferação. Observou-se que a infecção por *T. gondii* aumenta o número de células PCNA⁺ no intestino de camundongos BALB/c. Além disso, o tratamento com STAg aumentou o número de células PCNA⁺ ao longo do corpo dos vilos intestinais em

camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados, quando comparados com camundongos não infectados (Figura 16A). Não obstante, verificamos também que camundongos C57BL/6, altamente susceptíveis à inflamação intestinal (LIESENFELD *et al.*, 1996; BENEVIDES *et al.*, 2013), tiveram a função da barreira epitelial preservada quando tratados com STAg, uma vez que estes animais apresentaram menor concentração de FITC-dextran no soro (Figura 16B).

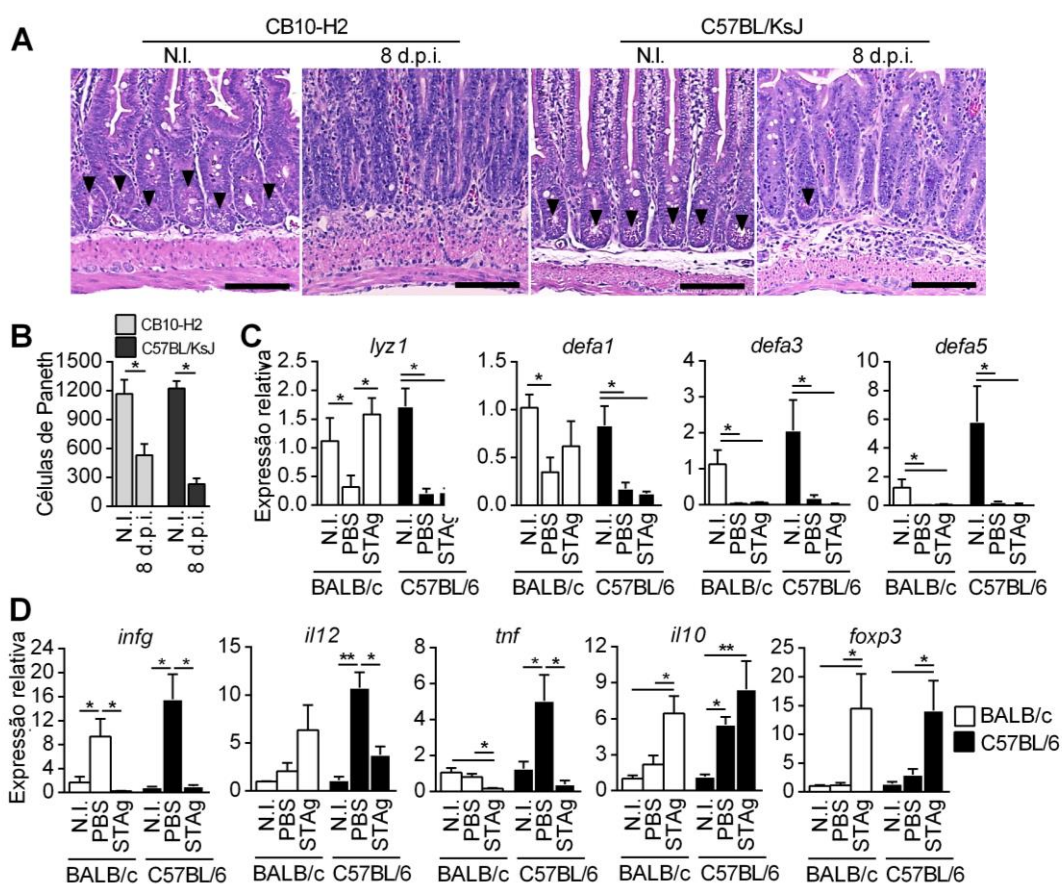


Figura 7. O tratamento com STAg não mantém totalmente a função das células de Paneth, mas induz resposta reguladora. Fotomicrografias (A) e quantificação (B) das células de Paneth em camundongos congênicos CB10-H2 e C57BL/KsJ infectados com *T. gondii*. Barras representam 100 μm; Setas pretas indicam as criptas com células de Paneth. (C) Análise por qPCR da expressão de peptídeos antimicrobianos no íleo de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados ou não com STAg. (D) Análise por qPCR da expressão de citocinas no íleo de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados ou não com STAg. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (n=3). N.I., não infectado. d.p.i., dias pós-infecção. *Teste *t* não-pareado, P<0,05.

Assim, investigamos através da expressão de mRNA dos genes *bmi1* e *Igr5*, se estas populações estão relacionadas com aumento da proliferação intestinal em camundongos infectados e tratados com STAg. Observamos que a infecção por *T. gondii* diminuiu a expressão de *Igr5*, independente se o animal foi tratado ou não com STAg (Figura 16C). Além disso, o tratamento com STAg foi capaz de aumentar a expressão de *bmi1* em ambas as linhagens de camundongo, comparados com os animais infectados não tratados e com os animais não infectados (Figura 16C). Estes dados sugerem que a redução do número de células de Paneth pode estar associado, pelo menos em parte, à redução da expressão de *Igr5* (ROTH *et al.*, 2012), embora o aumento da proliferação para manutenção da função da barreira epitelial intestinal é mantida principalmente pela população que expressa *bmi1*. Além

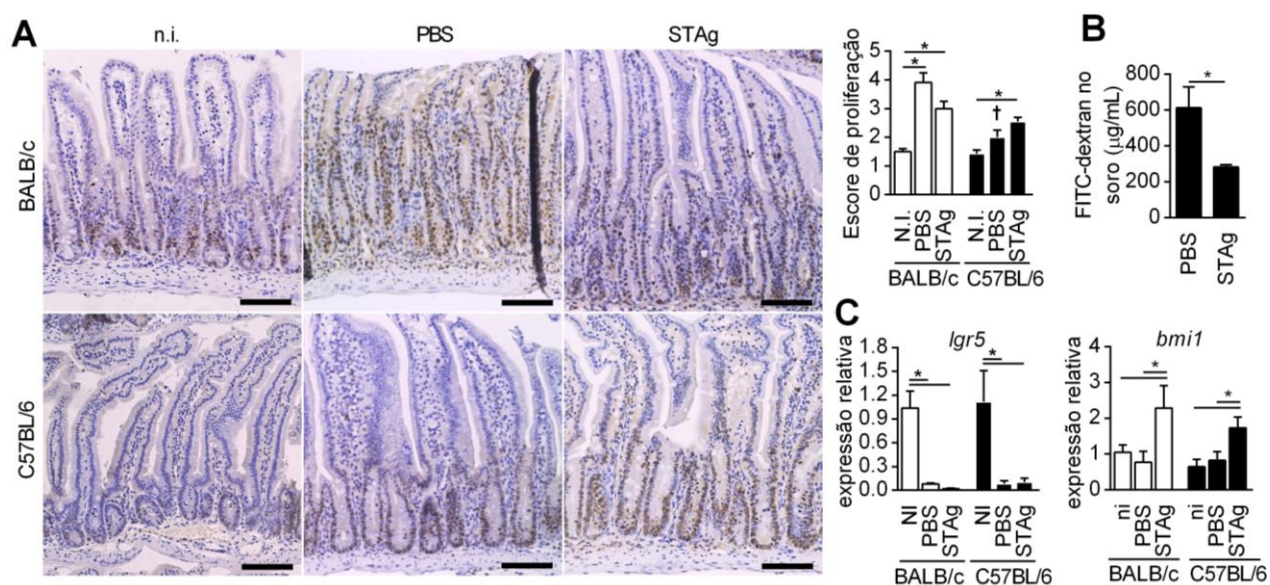


Figura 8. O tratamento com STAg protege a barreira epitelial intestinal pelo aumento da proliferação através da expressão de *bmi1*. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com STAg 48 horas antes da infecção e sacrificados aos 8 d.i. (A e B) Secções intestinais foram submetidas a marcação com PCNA (A) para quantificação da proliferação epitelial (B). Barras representam 100 µm. (C) Análise da expressão dos marcadores de células tronco *bmi1* e *Igr5*. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (n=3). N.I., não infectado. *Teste *t* não-pareado, $P < 0,05$.

disso, este é o primeiro relato entre os efeitos da infecção com *T. gondii* nestas populações de células tronco intestinais.

5.5. STAg previne a desregulação da microbiota em camundongos infectados

A infecção com *T. gondii* diminui a quantidade de células de Paneth no intestino, promovendo a desregulação da microbiota pela redução da quantidade de bactérias comensais (táxons Bacteroidetes e Firmicutes) e aumento de bactérias patogênicas do grupo Enterobacteriaceae, como *E. coli* (RAETZ *et al.*, 2013).

Observamos que o tratamento com STAg preveniu a alteração da população de Bacteroidetes em camundongos BALB/c e em C57BL/6 infectados quando comparados com o grupo infectado mas não tratado (Figura 17A). Camundongos

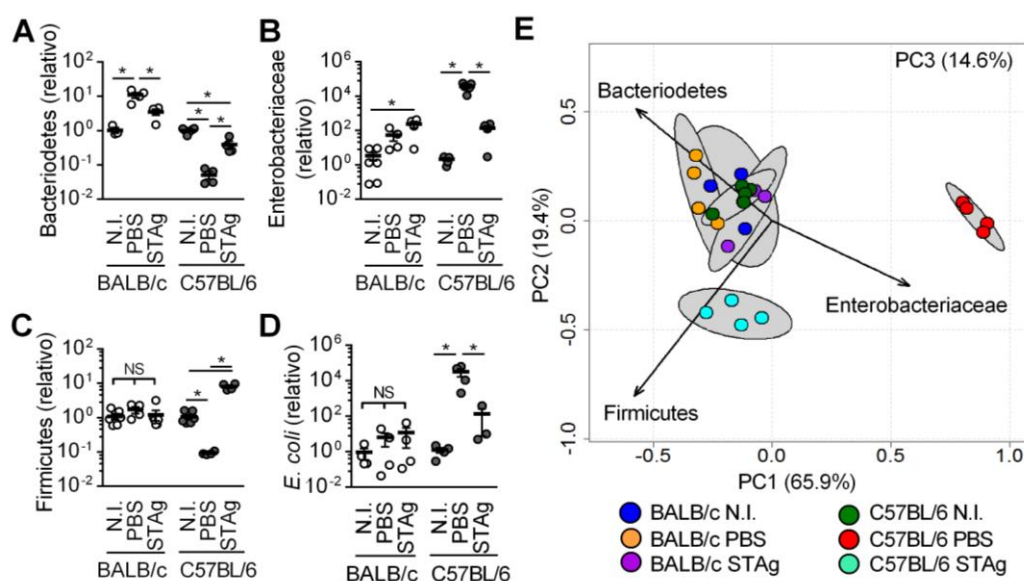


Figura 9. Tratamento com STAg previne disbiose em camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*. Amostras do conteúdo do intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados foram coletadas para extração de qDNA e análise por qPCR. (A-D) Quantificação das populações pertencentes ao grupos Bacteroidetes (A), Enterobacteriaceae (B), Firmicutes (C) e *E. coli* (D). (E) Os dados de quantificação bacteriana foram utilizados para análise de componente principal (PCA). Elipses representam intervalo de confiança de 95%. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (n=3). N.I., não infectado. *Teste *t* não-pareado, $P < 0,05$.

C57BL/6 infectados apresentaram aumento da população de Enterobacteriaceae no intestino, em comparação com o grupo tratado com STAg, e este efeito não foi observado em camundongos BALB/c (Figura 17B). A quantificação de *E. coli* apresentou perfis similares àqueles observados em Enterobacteriaceae (Figura 17D). Apesar de nem a infecção nem o tratamento com STAg serem capazes de alterar a população de bactérias do grupo Firmicutes em camundongos BALB/c; em C57BL/6, a infecção reduziu e o STAg aumentou a quantidade de bactérias deste grupo (Figura 17C). De fato, os animais não infectados e os infectados e tratados com STAg possuem diferentes populações de bactérias quando comparados com camundongos C57BL/6 infectados e não tratados, embora este perfil não seja observado na linhagem BALB/c (Figura 17E). Juntos, estes dados confirmam que o tratamento com STAg previne a disbiose intestinal através do controle de bactérias Enterobacteriaceae em favor do grupo de bactérias Firmicutes.

5.6. STAg aumenta a quantidade de sIgA específica no lúmen intestinal

Verificamos que o tratamento com STAg induziu maior produção de IgA anti-STAg no soro de camundongos infectados, quando comparado com animais infectados não tratados, independente das linhagens de camundongo (Figura 18A). Porém, somente camundongos C57BL/6 infectados e tratados com STAg apresentaram níveis detectáveis de sIgA anti-STAg e anti-*E. coli* no lúmen intestinal (Figura 18B). Estes dados estão de acordo com as diferenças de populações bacterianas encontradas em camundongos C57BL/6 (Figura 17E), pois a secreção de elevados níveis de IgA anti-*E. coli* estão associados com o controle da população de *E. coli* (Figura 17D) nos camundongos infectados tratados com STAg.

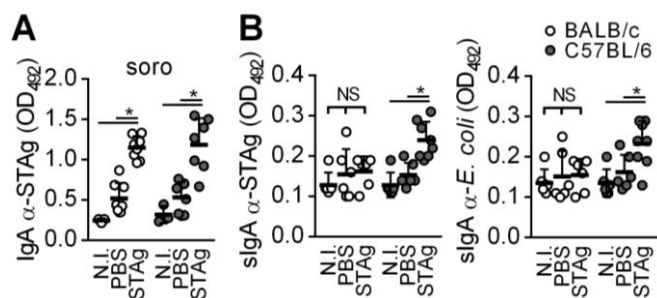


Figura 10. Tratamento com STAg induz a produção de sIgA anti-*E. coli*. (A) Quantificação por ELISA de IgA sérica anti-STAg de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados tratados ou não com STAg. (B) Quantificação de sIgA anti-STAg e anti-*E. coli* solúvel no conteúdo intestinal. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (n=4). N.I., não infectado. *Teste *t* não-pareado, $P < 0,05$.

6. DISCUSSÃO (CAPÍTULO I)

Nosso grupo descreveu anteriormente que o tratamento com STAg protege camundongos contra o desenvolvimento de patologias intestinais durante a infecção oral com *T. gondii* (BENEVIDES *et al.*, 2013). Outro estudo mostrou que a injeção de STAg 24 horas antes da infecção com *T. gondii* protegeu camundongos deficientes em IL10 contra infecção aguda, uma vez que a produção de IL12 pelas células dendríticas foi diminuída (REIS E SOUSA *et al.*, 1997). Porém, o mecanismo pelo qual STAg promove esta proteção não é totalmente conhecido.

Mostramos que o tratamento com STAg 48 horas antes da inoculação do parasita foi capaz de preservar o número de células de Paneth no intestino durante a infecção por *T. gondii*, embora não manteve a expressão de α -defensinas. O efeito de infecções no número de células de Paneth parece ser dependente de cada patógeno. Foi demonstrado que a infecção com *T. gondii* resulta na disbiose e na eliminação passageira das células de Paneth, as quais não são detectadas após 7 dias de infecção (RAETZ *et al.*, 2013). As células de Paneth secretam produtos antimicrobianos como lisozimas, α -defensinas, fosfolipase A2 e a lectina RegIIIy (SANTAOLALLA; ABREU, 2012). Defensinas apresentam atividade microbicida e mediam mecanismos de defesa contra bactérias, fungos, protozoários e vírus (GANZ, 2003). Portanto, a preservação de células de Paneth parece de alguma forma ter contribuído para a proteção dos animais previamente tratados com STAg durante a infecção por *T. gondii*.

As células tronco intestinais residem entre as células de Paneth na base da cripta e se dividem diariamente (SNIPPERT *et al.*, 2010). No intestino, estas células dividem-se continuamente para produção de células altamente-proliferativas capazes de se diferenciarem em qualquer linhagem celular epitelial (POTTEN;

BOOTH; PRITCHARD, 1997). Porque as células tronco Lgr5⁺ e Bmi1⁺ são responsáveis por gerar novas células para manter a homeostase da barreira epitelial intestinal e a produção de moléculas antimicrobianas, a depleção destas populações promovem inflamação intestinal mediada por bactérias (GERSEMANN; STANGE; WEHKAMP, 2011). Além disso, a redução da expressão de IFN γ e TNF e elevada expressão de IL10 estão relacionadas com a proliferação intestinal (KOCH; NUSRAT, 2012), bem como com a redução do escore inflamatório encontrado nos animais tratados com STAg.

O recrutamento de células de Paneth capazes de se diferenciarem em células Bmi1⁺ representam um mecanismo provável para regeneração das células Lgr5⁺ (KOCH; NUSRAT, 2012). As células tronco Bmi1⁺ são uma população de células multipotentes responsáveis por manter a arquitetura intestinal e que também originam células Lgr5⁺ *in vivo* e *in vitro* (TIAN *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2012). Durante o processo de homeostase, as células de Paneth parecem atuar como auxiliares para as células tronco Lgr5⁺, entrando em estado proliferativo e ativando a expressão de *bmi1* e silenciando genes específicos das células de Paneth durante injúria tecidual (ROTH *et al.*, 2012). Demonstramos que o tratamento com STAg foi capaz de aumentar a expressão de *bmi1* e manter a população de células de Paneth, as quais parecem estar relacionadas com a manutenção da barreira epitelial.

A microbiota desempenha um papel crucial na modulação da resposta imune inflamatória durante a infecção por *T. gondii*. De fato, a inflamação exacerbada em observada em camundongos C57BL/6 infectados é resultante principalmente da resposta a bactérias intestinais do que contra o parasita, uma vez que camundongos gnotobióticos (*germ-free*, livres de bactérias intestinais) não desenvolvem patologia

durante a infecção (HEIMESAAT *et al.*, 2006; BENSON *et al.*, 2009; RAETZ *et al.*, 2013). A desregulação da microbiota provocada pela depleção das células de Paneth durante a infecção por *T. gondii* permite a expansão de bactérias Gram-negativas patogênicas (*E. coli* e *Shigella* spp.) (RAETZ *et al.*, 2013). Bactérias comensais presentes no intestino exercem um efeito imunomodulador em células dendríticas durante a infecção por *T. gondii* em camundongos deficientes de TLR11 (BENSON *et al.*, 2009).

Demonstramos que o tratamento com STAg foi capaz de induzir maiores níveis de IgA secretada no lúmen intestinal específica contra *E. coli*, o que está associado diretamente com os menores níveis destas bactérias na composição da microbiota intestinal. Atualmente é bem estabelecido que as células T_{REG} (que expressam Foxp3) são importantes fontes de IL10 e TGF β , as quais modulam respostas inflamatórias T_{H1} no intestino, incluindo em Doença de Crohn (YAN *et al.*, 2012). Estudos também mostraram o papel crucial das células T_{REG} no controle da produção de IgA no intestino de maneira dependente de linfócitos T e de TGF β (CONG *et al.*, 2009; TSUJI *et al.*, 2009). Observamos que o aumento da expressão de *foxp3* está associado com aumento da síntese de IgA para o controle de bactérias no lúmen intestinal. Além disso, o sistema de produção de IgA não apresenta características de memória como o sistema de IgG e, dependendo do número de bactérias, adapta-se continuamente contra as espécies dominantes no intestino (HAPFELMEIER *et al.*, 2010). Isto também está de acordo com nossos resultados, uma vez que camundongos C57BL/6 apresentam uma falha na produção de IgA contra *E. coli* durante a infecção por *T. gondii*, a qual é compensada nos camundongos tratados com STAg nos quais a produção da IgA é aumentada para controle de populações patogênicas.

Juntamente com dados previamente publicados (BENEVIDES *et al.*, 2013), o tratamento com STAg diminui a patologia intestinal e as respostas inflamatórias (Figura 19). Com o presente estudo mostramos mecanismos adicionais mediados pelo tratamento prévio com STAg que são capazes de proteger camundongos C57 contra a infecção oral letal por *T. gondii*. Esses mecanismos induzidos pelo tratamento prévio com STAg estão relacionados com a manutenção das células de Paneth e aumento da proliferação epitelial relacionada com o marcador de células tronco *bmi1*, contribuindo, portanto, com a função da barreira epitelial intestinal.

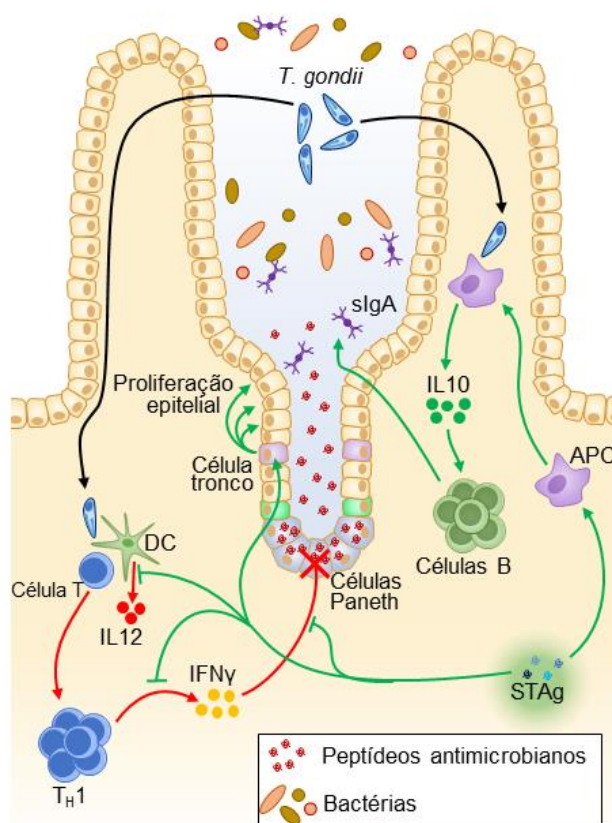


Figura 11. Efeitos do tratamento com STAg na modulação da resposta imune intestinal. STAg modula a resposta inflamatória no intestino delgado de camundongos infectados: (1) indução da produção de IL10 por células residentes da mucosa intestinal; (2) redução da produção de IL12 e consequentemente da polarização do perfil de linfócitos T CD4⁺ mediada por IFN γ ; (3) manutenção do número de células de Paneth; (4) indução da proliferação epitelial e consequente manutenção da barreira epitelial intestinal e; (5) indução de slgA contra bactérias patogênicas para controle da microbiota intestinal.

Além disso, o tratamento prévio com STAg também aumentou a produção de sIgA no lúmen de camundongos C57BL/6, o que está diretamente relacionado com o controle de populações bacterianas patogênicas. Por fim, este trabalho reforça o uso do STAg como uma terapia proteica reguladora para o controle de doenças inflamatórias intestinais associadas com a microbiota.

CAPÍTULO 2

Imunização com *TgHSP70* induz imunidade protetora contra a formação de cistos cerebrais em infecção por *T. gondii*

7. INTRODUÇÃO (CAPÍTULO II)

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

As HSPs pertencem a um grupo de chaperonas altamente conservadas e são expressas tanto de forma constitutiva quanto induzida em células de quase todos os seres vivos. As HSPs são classificadas em famílias: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e as pequenas HSPs (sHSPs), de acordo com sua massa molecular aproximada em gel de poliacrilamida (LIU; DANIELS; CAO, 2012). Sob condições de estresse, como temperatura elevada, estresse químico/oxidativo, infecção ou inflamação, a expressão de HSPs tem sido associada com a proteção contra efeitos deletérios destas condições (LIU *et al.*, 1992).

A HSP70 de *T. gondii* (*TgHSP70*) é expressa durante a diferenciação de taquizoítas para bradizoítas (WEISS *et al.*, 1998) e de bradizoítas para taquizoítas (SILVA *et al.*, 1998). Em camundongos infectados com a cepa Fukaya (tipo II) e tratados com HSP70 recombinante de *T. gondii*, foi possível detectar a expressão de *TgHSP70* em macrófagos peritoneais e redução de óxido nítrico tanto em camundongos BALB/c e C57BL/6 (controles) quanto naqueles deficientes em IFN γ (IFN γ ^{-/-}) e sugerindo que ela seja um sinal de perigo durante a infecção aguda por *T. gondii* (MUN *et al.*, 2000a). Além disso, a *TgHSP70* é uma molécula que possui elevado potencial imunogênico (MUN; AOSAI; YANO, 1999; MA *et al.*, 2009) e por isso é considerada uma boa opção de antígeno para imunização e/ou vacinação contra *T. gondii*. Quando camundongos infectados com *T. gondii* são inoculados com *TgHSP70*, a proteína é reconhecida por células do baço CD11b⁺ e é capaz de ativar o fator de ativação de plaquetas (PAF) mediada pela via TLR4-MyD88 (FANG *et al.*, 2006). Foi mostrado que a proteína também é capaz de estimular a produção de NO através da expressão da proteína iNOS em macrófagos ativados por uma via

mediada pelas proteínas TLR2, MyD88 e IRAK4 (MUN *et al.*, 2005). Além disso, a TgHSP70 também funciona como um mitógeno que induz a proliferação de células B através de TLR4 por uma via independente de MyD88 (AOSAI *et al.*, 2002).

Recentemente, um trabalho de nosso grupo mostrou que a detecção da TgHSP70 no cérebro está relacionado com a replicação do parasita e sua detecção no soro está relacionada com a morte de parasitas (BARENCO *et al.*, 2014). Este trabalho também mostrou que a formação de imunocomplexos anti-TgHSP70 estava relacionada com o melhor prognóstico em camundongos BALB/c (BARENCO *et al.*, 2014).

7.2. Imunização e vacinas contra toxoplasmose

Diversos antígenos microbianos são capazes de interagir com TLRs associados à membrana ou presentes em compartimentos de membrana citoplasmáticos para o desenvolvimento da resposta imune (GAY; GANGLOFF, 2007). Nos processos de imunização são comumente utilizados moléculas adjuvantes capazes de ampliar ou direcionar a resposta imune do hospedeiro de acordo com a finalidade, uma vez que proteínas purificadas somente têm baixo potencial de desenvolver imunidade protetora e duradoura (FOGED, 2011). O adjuvante completo de Freund (ACF) é constituído por partículas de *M. tuberculosis* inativadas pelo calor, dissolvidas em óleo mineral produzido a partir do petróleo contendo hidrocarbonetos de cadeia longa e um composto emulsificante (oleato de manitol) (O'HAGAN, 2000). Desde sua primeira descrição em 1916, o ACF é amplamente utilizado na pesquisa e induz resposta celular e humoral (O'HAGAN, 2000; STILLS, 2005). Porém, vários trabalhos mostram que o ACF é capaz de gerar lesões teciduais localizadas, granulomas renais, dermatite necrozante e outros

efeitos adversos devido ao inóculo do composto. Por tal motivo, não é permitido o uso deste tipo de adjuvante em humanos e animais, e seu uso é somente liberado para pesquisa (STILLS, 2005).

O hidróxido de alumínio (conhecido como alúmen) é um adjuvante mineral amplamente utilizado na vacinação em humanos devido ao seu bom histórico em termos de segurança biológica, baixo custo e capacidade de adsorção com vários tipos de antígenos (O'HAGAN, 2000; STILLS, 2005; MBOW *et al.*, 2010). O alúmen é uma molécula capaz de estimular a ativação do sistema imune por uma via independente de TLR e dependente da via do inflamassomo Nalp3, gerando ativação de caspase 1 e IL8 (GAVIN *et al.*, 2006; EISENBARTH *et al.*, 2008). Além disso, o contato superficial da membrana plasmática de células dendríticas é capaz de estimular a ativação por uma via iniciada por ITAM (motivo de ativação de imunoreceptor baseado em tirosina) e Syk ("Spleen tyrosine kinase"), levando a apresentação do antígeno adsorvido para células T CD4⁺ e posterior produção de imunoglobulinas pelas células B (FLACH *et al.*, 2011).

A porção C-terminal da HSP70 apresenta maior antigenicidade do que a porção N-terminal em *T. gondii*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Naegleria fowleri* e *Mycobacterium tuberculosis* (AMORIM *et al.*, 1996; MUN *et al.*, 2000a; SONG *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2013). Por causa desta propriedade, a HSP70 de *M. tuberculosis* tem sido utilizada como molécula adjuvante na imunização contra *M. tuberculosis*, contra o vírus da encefalite japonesa (JEV) e contra o vírus influenza A (GE *et al.*, 2006; EBRAHIMI; TEBIANIAN, 2010; UTO *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que a imunização de animais uma única vez com TgHSP70 emulsificada em adjuvante completo de Freund e posterior desafio com cistos da cepa Fukaya de *T. gondii* não gera proteção contra a infecção (MUN; AOSAI; YANO,

1999). Porém, a vacinação utilizando gene *TgHSP70* promoveu imunidade protetora e redução da carga parasitária em camundongos C57BL/6, mas não com os genes de BAG1 ou SAG1 (MOHAMED *et al.*, 2003). Também foi verificada que a vacinação com plasmídeo contendo o gene de *TgHSP70* promove aumento da sobrevivência de animais C57BL/6 e diminuição do escore de reação anafilática de camundongos BALB/c quando estes animais eram infectados e induzidos ao choque anafilático com a proteína *TgHSP70* (KIKUMURA *et al.*, 2010). Além disso, foi mostrado que a vacinação com pDNA codificando o gene de *TgHSP70* é capaz de ativar células dendríticas pela via TLR4/MyD88, estimulando a produção de citocinas do perfil T_H1, como IL12 e IFN γ durante a fase aguda da infecção (MAKINO *et al.*, 2011).

TgHSP70 é uma molécula com elevado potencial antigênico e é um bom candidato a vacinação contra toxoplasmose. O alúmen é um adjuvante capaz de estimular a resposta imune pela via de receptores tipo NOD (NLRs), além de ser um dos poucos adjuvantes licenciados para uso em humanos.

8. OBJETIVOS (CAPÍTULO II)

8.1. Geral

Avaliar o perfil protetor da resposta de camundongos imunizados com a proteína *TgHSP70* na infecção crônica por *T. gondii*.

8.2. Específicos

- Imunizar camundongos C57BL/6 com *TgHSP70* pura ou adsorvida em alúmen e avaliar a morbidade frente a infecção pela cepa ME49 de *T. gondii*;
- Quantificar o parasitismo no cérebro nos animais infectados, bem como avaliar o escore histológico cerebral;
- Avaliar o perfil de citocinas e imunoglobulinas (IgG, IgG1 e IgG2a) anti-*TgHSP70* e anti-STAg no soro dos animais experimentais;
- Analisar o efeito do estímulo *in vitro* com *TgHSP70* nas células do baço através da proliferação de diferentes populações fenotípicas, bem como da produção de citocinas.
- Avaliar o papel dos anticorpos anti-*TgHSP70* na inibição da produção de NO em células RAW264.7.

9. MATERIAL E MÉTODOS (CAPÍTULO II)

9.1. Animais, linhagens celulares e cepas de *T. gondii*

Camundongos fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, da linhagem C57BL/6 foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, livres de patógenos específicos, em microisoladores e com acesso à ração e água *ad libitum* segundo as normas Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) e aprovação sob número de protocolo 106/10 (Anexo 1). A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em camundongos Swiss Webster inoculados por via oral com 20 cistos de *T. gondii* pelo menos um mês antes da coleta dos cistos do cérebro, o qual foi homogeneizado em tampão fosfato-salino (PBS) e os cistos contados e utilizados para infectar os animais.

As linhagens celulares de macrófagos (RAW264.7) e fibroblastos (NIH) de camundongos foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado (SFB, Cultilab) e antibióticos (Penicilina e Estreptomicina, Sigma) e mantidas em incubadora úmida para cultivo celular a 37 °C e CO₂ 5%. Parasitas transgênicos 2F1 (“β-gal clone”) da cepa RH de *T. gondii* (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996) foram mantidos em culturas de fibroblastos NIH por passagens a cada 2 dias em RPMI SFB 2%.

9.2. Expressão de *TgHSP70* em *E. coli* e purificação por cromatografia

A expressão em *E. coli* e posterior purificação de *TgHSP70* por cromatografia foram feitos como descrito anteriormente com modificações (BARENCO *et al.*, 2014). Brevemente, uma colônia foi inoculada em 1 L de meio LB com antibióticos (ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL; Sigma) e incubada a 37 °C sob agitação até alcançar DO₆₀₀ de 0,5 para indução com 0,1 mM de IPTG (Sigma).

Após incubação sob agitação a 20 °C por 20 horas, a cultura foi centrifugada (4000 ×g, 20 min, 4 °C) e o sedimento ressuspendido em 30 mL de tampão de lise contendo lisozima (BARENCO *et al.*, 2014) e incubado por 30 minutos sob agitação. Foi adicionado 0,1% de Triton-X100 (Sigma) ao extrato, o qual foi então submetido a 6 ciclos de criólise seguido de sonicação em gelo (8 ciclos de 30 segundos com intervalos de 5 segundos) para lise. Por fim, o extrato foi centrifugado (10,000 ×g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade em resina de glutationa (GE Healthcare) como descrito (BARENCO *et al.*, 2014). Por fim, a amostra foi passada em coluna de polimixina B para remoção de LPS e centrifugada em tubos Vivaspin 50 MWCO tubes (GE Healthcare) e a concentração proteica mesurada pelo método de Bradford e foram armazenadas a -20°C.

9.3. Imunização de camundongos com proteínas recombinantes

Camundongos C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 200 µL de uma solução contendo 10 µg de TgHSP70 diluída em PBS ou adsorvida v/v em alúmem (Alhydrogel 2%, InvivoGen) de acordo com o grupo experimental (Tabela 1) e receberam outras doses após 2 e 4 semanas após a primeira dose (Figura 5A). Duas semanas após a última imunização, pelo menos 3 animais de cada grupo foram anestesiados (Ketamine 100 mg/Kg e Xilazine 5 mg/Kg) e sacrificados por deslocamento cervical para coleta do baço para os ensaios de fenotipagem e estímulo *in vitro* (Figura 1A). Pelo menos 3 animais de cada grupo foram infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e sacrificados 30 dias depois, como descrito acima, para coleta do cérebro para contagem de cistos a fresco, quantificação por qPCR e para fixação em formol tamponado 10%. Durante todo o

experimento, os animais foram observados diariamente quanto á variações de peso e escore de morbidade (BARTLEY *et al.*, 2006) e o sangue coletado a cada duas semanas para análise de anticorpos e citocinas no soro.

Tabela 3. Grupos experimentais que foram utilizados para avaliação do potencial imunogênico da proteína TgHSP70 adsovida com alumínio.

| Grupo | Antígeno | Veículo/adjuvante |
|-------|-----------------|-------------------|
| 1 | - | PBS |
| 2 | TgHSP70 (10 µg) | PBS |
| 3 | - | PBS+Alúmem |
| 4 | TgHSP70 (10 µg) | PBS+Alúmem |

9.4. Análises histológicas e imunohistoquímicas

Secções histológicas do cérebro incluído em parafina foram desparafinadas e hidratadas para coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E) e reações de imunohistoquímica. O escore do infiltrado inflamatório no cérebro (SILVA *et al.*, 2009) foi feito pela avaliação do número total de focos inflamatórios focais (nódulos gliais) ou difusos em secções sagitais e na bainha dos vasos sanguíneos (manguito perivascular), bem como a infiltração de células inflamatórias nas meninges. Os escore inflamatório no cérebro é representado como unidades arbitrárias como sendo: 0-2, suave; 2,1-4, moderado; 4,1-6, grave; e acima de 6, muito grave. Todas as análises foram feitas com a objetiva de 40x de aumento em ensaio duplo cego de duas secções histológicas por animal.

9.5. Quantificação de parasitos no cérebro

O número de cistos foi avaliado pela contagem a fresco. Para isso, um hemisfério cerebral de cada animal foi homogeneizado em 2 mL de PBS utilizando seringa com agulha 27G. Em seguida, 20 µL desta solução contendo os cistos foram adicionadas entre lâmina e lamínula para contagem por dois observadores independentes, em duplicata. O número de cistos contados foi corrigido pela

concentração na solução e multiplicado por 2 para obtenção do número de cistos por cérebro.

A quantificação de parasitas por qPCR foi feita com o DNA genômico (gDNA) extraído utilizando o método do Trizol (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada a quantificação absoluta usando *primers* para o gene B1 (FW: GGAGGACTGGCAACCTGGTGTCTG; RV: TTGTTTCACCCGGACCGTTTAGCAG) juntamente com 10 ng de gDNA e SYBR no aparelho ABI7500 (Life Technologies). O número de parasitas foi calculado por interpolação na curva padrão de gDNA de taquizoítas de *T. gondii*.

9.6. Quantificação de IgG total, IgG1, IgG2a anti-TgHSP70

A quantificação de imunoglobulinas foi realizada em placas de baixa afinidade (Kartell) sensibilizadas com 2,5 µg/mL de TgHSP70 ou STAg em tampão carbonato-bicarbonato (50 µL/poço), a 4°C por 18 horas. Após 3 lavagens com PBS-Tween20 0,05% (PBS-T), as placas foram incubadas com PBS-T Molico 5% (PBS-TM 5%) por 1 hora. Após 3 novas lavagens, as amostras de soro diluídas em série (diluição inicial de 1:50, fator de diluição igual a 5) em PBS-TM 1% foram adicionadas (50 µL/poço) juntamente com amostras-padrão negativas e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após 6 lavagens, as placas foram incubadas com anticorpos de cabra anti-IgG total (Sigma), anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Santa Cruz) conjugados com peroxidase diluídos 1:2000 em PBS-TM 5% (50 µL/poço) e incubadas a 37 °C por 1 hora. As placas foram lavadas 6 vezes e a reação foi desenvolvida com OPD 0,5 mg/mL (50 µL/poço, *o-Phenylendiamin*, Sigma) e interrompida com ácido sulfúrico 2N (25 µL/poço) para leitura a 492 nm em leitora VersaMax Microplate Reader (Molecular

Devices). Os títulos de anticorpos foram calculados por regressão linear da curva de diluição de cada soro (CROWTHER, 2009).

9.7. Quantificação de imunocomplexos (ICs) anti-TgHSP70 no soro

A detecção de CI foi realizada como descrito por (BARENCO *et al.*, 2014; CHAVES-BORGES *et al.*, 1999), utilizando placas de baixa afinidade (Kartell) sensibilizadas com anticorpo IgY anti-TgHSP70 (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato pH9,6 e incubado a 4 °C durante a noite. Após lavagens, foi adicionado o soro dos animais diluído 1:40 em PBS-TM 1% (Nestlé). Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:1000. A reação foi revelada com OPD (Sigma) e parada com H₂SO₄ 2 N. A absorbância foi mensurada a 495 nm em leitora de microplacas TP Reader (Thermoplate). Os níveis foram calculados por índice ELISA como previamente descrito (BARENCO *et al.*, 2014).

9.8. Immunoblotting

As proteínas presentes no STAg foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, Millipore). As membranas foram bloqueadas com PBS-TM 5% por 1 hora e incubada com amostra de soro diluídas 1:100 em PBS-TM 1% durante a noite. Após lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:4000 em PBS-TM 1%. Depois de novas lavagens, as bandas foram reveladas com DAB (Sigma) e documentadas com escâner Scanjet

G4050 (Hewlett-Packard). Todos os passos foram realizados a temperatura ambiente.

9.9. Análise da proliferação e fenotipagem de células do baço

O baço dos animais foi coletado e macerado em peneira de 70 μm . Após centrifugação (400 $\times\text{g}$, 10 min, 4 °C), o sedimento foi ressuspensionado em tampão para lise (NH_4Cl 144 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,4) para obtenção das células do baço livre de hemácias. Para análise de proliferação, as células foram contadas em câmara de NeueBauer, aliquotadas (1×10^7 células por tubo) e marcadas com CFSE 5 μM (5(6)-*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Life Technologies) por 10 minutos coberto da luz. As células foram então centrifugadas, ressuspensionadas em meio contendo antibióticos, glutamina, SFB 10% e β -mercaptoetanol e plaqueadas (1×10^5 células por poço) em placas de “fundo em U” (Falcon) com os seguintes estímulos: TgHSP70 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, STAg 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Concanavalina A (ConA, Sigma) 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, Sigma) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após incubação em estufa umidificada de cultivo celular a 37 °C por 72 horas, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas, e as células foram submetidas a fenotipagem celular.

A fenotipagem celular foi realizada tanto com células imediatamente isoladas dos animais quanto com células reestimuladas *in vitro*. As células foram primeiramente incubadas com 50 μL de PBS com soro normal de coelho 5% (PBS-SNC) por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo/poço 50 μL da mistura de anticorpos diluídos 1:200 em PBS-SNC. Foram utilizados os seguintes anticorpos: $\alpha\text{CD3-BV}$, $\alpha\text{CD4-PECy7}$, $\alpha\text{CD8-APC}$, $\alpha\text{CD19-APC}$, $\alpha\text{CD80-PE}$, $\alpha\text{CD86-PECy7}$ (BD Biosciences). Após incubação por 30 minutos, as células foram

centrifugadas a 400 ×g, fixadas em formol 3,7% e adquiridas no citômetro FACSCanto-II (BD Biosciences) e analisadas pelo software FlowJo 10 (TreeStar).

9.10. Quantificação de citocinas

A quantificação de citocinas (IL2, IL4, IL6, IL10, IFN γ , TNF e IL17) no soro de camundongos antes e depois da infecção foi feita por CBA (*cytometric bead assay*) seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences). Brevemente, os soros dos animais foram misturados v/v com esferas conjugadas com os anticorpos de captura e com anticorpos de detecção fluorescentes. Após incubação de 2 horas, as amostras foram lavadas e mensuradas no citômetro FACSCanto-II e analisadas pelo software FACSDiva (ambos da BD Biosciences) por interpolação dos dados na curva padrão. O perfil de citocinas foi ilustrado utilizando o programa Excel (Microsoft).

A quantificação de citocinas (IFN γ e IL10) secretadas no sobrenadante de células do baço foi feita por *kits* de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (RD Bioscience). Em suma, placas de alta afinidade (Costar-Corning) foram sensibilizadas com anticorpos de captura, lavadas e incubadas com as amostras juntamente com a curva padrão. Após lavagem, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção, lavadas novamente e incubadas com estreptoavidina-peroxidase para desenvolvimento da coloração com TMB (*3,3'-5,1'-tetramethylbenzidine*, Sigma) e posterior leitura a 450 nm em leitora VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices).

9.11. Ensaios de inibição da infecção e lise mediada por complemento

O ensaio de inibição da infecção mediada pelo soro imune foi baseado em uma publicação anterior com modificações (SAYLES; GIBSON; JOHNSON, 2000). O

soro de animais imunizados com PBS ou TgHSP70 e animais infectados por 4 semanas foram utilizados em *pools*. Metade do volume foi transferido para outro tubo e incubado a 56 °C por 30 minutos para inativação do complemento. A seguir, cada soro foi diluído em meio de cultura (concentração 2,5%), esterilizado em filtro 0,22 µm e utilizado para ressuspender taquizoítas 2F1 da cepa RH, seguido de incubação por 10 minutos. Os parasitas (1×10^5) foram então utilizados para infectar cultura de fibroblastos confluentes em placa de 96 poços. Vinte e quatro horas depois, o sobrenadante foi removido e a quantificação dos parasitas foi realizada pelo ensaio de β-galactosidase usando o substrato CPRG como descrito (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996).

A avaliação da lise mediada por complemento foi realizada como descrito anteriormente com modificações (DANDO *et al.*, 2001). O soro de todos os grupos de animais imunizados antes (semana 6) e após 30 dias de infecção (30 d.p.i., semana 10) foram diluídos 1:4 em PBS, incubados a 56 °C por 30 minutos para inativação do complemento e depois adicionados (75 µL) a placas de micro titulação. Paralelamente, taquizoítas 2F1 da cepa RH (5×10^7 parasitas/mL) foram diluídos v/v com soro normal de camundongo (pré-diluído v/v em PBS). Em seguida, 50 µL da mistura de parasitas foi adicionado em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C por 15 minutos, centrifugada a 1.000 ×g por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado e aplicado a uma nova placa (50 µL em duplicata) para quantificação usando CPRG (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996) sem a adição de tampão de lise.

9.12. Imunofluorescência

Taquizoítas da cepa RH 2F1 fixados em formalina foram adicionados em lâminas e deixadas para secar. As lâminas foram incubadas a 37°C por 1 hora com

o soro de camundongos cronicamente infectados ou com soro de camundongos imunizados com *TgHSP70*, ambos diluídos 1:100 em PBS. Após lavagens, as lâminas foram incubadas a 37°C por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com CF633 (Sigma) diluído 1:600 em PBS. Finalmente, lâminas foram rinsadas e montadas com glicerina para análise em microscópio confocal LSM 510 Meta (Zeiss).

9.13. Ensaio de inibição da produção de NO

O ensaio de inibição da produção de NO em células RAW264.7 foi feito com base em publicações anteriores com modificações (DOBBIN; SMITH; JOHNSON, 2002; MUN et al., 2005). Células plaqueadas (5×10^4) foram tratadas com meio contendo 2,5% de soro de animais imunizados juntamente com *TgHSP70* em diferentes concentrações (0,3 até 10 µg/mL, fator de diluição 2). Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi coletado para quantificação de NO pelo método de Griess.

9.14. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Os grupos foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) e analisados pelo teste *t* não pareado ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

10. RESULTADOS (CAPÍTULO II)

10.1. Imunização com *TgHSP70* promove redução do número de cistos

O primeiro objetivo foi avaliar se a imunização com *TgHSP70* possui um papel protetor contra a toxoplasmose. Para isso, camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados com *TgHSP70* diluída em PBS ou adsorvida em alúmen (Figura 5A). Durante o período de imunização, foi observado que todos os grupos de imunização apresentaram aumento da massa corpórea progressivamente (Figura 5B). Além disso, em nenhum momento durante o período de imunização, os animais apresentaram aumento do escore de morbidade (dados não mostrados), o qual varia numa escala de 0 a 7, onde 0 representa um escore sadio e 7 um escore de um camundongo totalmente debilitado. Estes resultados sugerem que nem *TgHSP70* nem o alúmen isoladamente ou combinados são capazes de provocar alterações clínicas negativas em camundongos sadios.

Após 6 semanas de imunização, os animais foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via oral. Durante o período de infecção, todos os grupos experimentais apresentaram perda brusca de peso corpóreo aos 9 dias após a infecção juntamente com aumento do escore de morbidade (Figura 5, C e D). Após este dia, os animais apresentaram leve perda de peso gradual e mantiveram o escore de morbidade (Figura 5, C e D). Após 4 semanas de infecção, os camundongos foram sacrificados para coleta do cérebro para contagem de cistos a fresco. Foi observado que camundongos imunizados com *TgHSP70* diluída em PBS ou adsorvida em alúmen apresentaram redução da quantidade de cistos no cérebro comparado com camundongos injetados somente com PBS (Figura 5E). Estes resultados foram confirmados por qPCR (Figura 5F). Em relação às alterações inflamatórias foi observado que os animais inoculados com PBS ou alúmen

apresentaram alterações inflamatórias graves no cérebro (Figura 5G), que foram caracterizadas por infiltrado de células inflamatórias nas meninges, manguito perivascular, nódulos gliais e células inflamatórias pelo parênquima (Figura 5H).

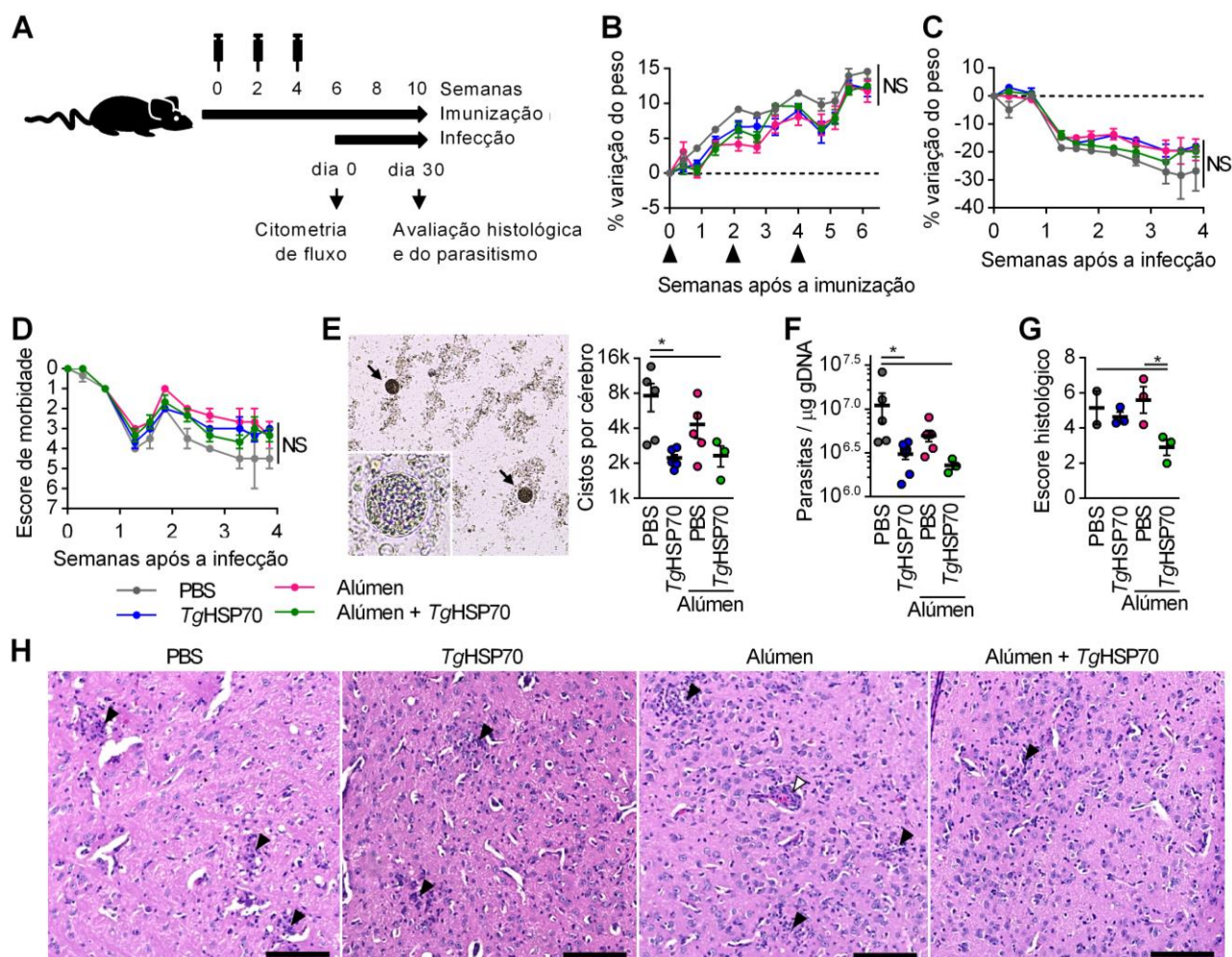


Figura 12. Imunização com *TgHSP70* promove redução do número de cistos cerebrais. (A) Camundongos C57BL/6 foram imunizados com *TgHSP70* diluída em PBS ou adsorvida em alúmen e infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*. Os animais foram observados quanto à perda de peso durante os períodos de imunização (B) e infecção (C), bem como quanto ao escore de morbidade durante a infecção (D). As setas em (B) indicam as semanas em que os camundongos foram imunizados. Na 4ª semana de infecção, os animais foram sacrificados para quantificação de cistos a fresco (setas) (E). (F) Quantificação de *T. gondii* no cérebro por qPCR. Quantificação do escore histológico (G) e fotomicrografias representativas do cérebro dos animais imunizados (H). Seta preta, foco inflamatório; Seta branca, manguito perivascular. Barras representam 100 μm . Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos 3 camundongos por grupo. *Tg*, Grupo infectado com *T. gondii*. * Teste *t* não-pareado, $p < 0,05$.

Essas lesões também foram observadas em animais imunizados somente com *TgHSP70*, porém foram menos graves, e os animais imunizados com *TgHSP70* adsorvida em alúmen apresentaram lesões mais suaves no cérebro (Figura 5H). Estes dados sugerem que imunização com *TgHSP70* promove redução do parasitismo cerebral e, juntamente com o alúmen, diminuem a inflamação no cérebro de camundongos infectados.

10.2. Imunização com *TgHSP70* não altera o perfil de citocinas no soro

Devido aos efeitos protetores observados, hipotetizamos que houvesse alguma alteração no perfil de citocinas presentes no soro que explicasse a proteção observada nos camundongos imunizados com *TgHSP70*. Para tanto, amostras de soro de animais antes e depois da imunização foram submetidas a quantificação de citocinas por CBA. Foi observado que a imunização não induz a produção de citocinas de estimulação da proliferação de células T (IL2), de regulação da inflamação (IL10), e nem de polarização para respostas de perfil T_H2 (IL4) ou T_H17 (IL17a) em camundongos infectados (Figura 6A). Além disso, a infecção por *T. gondii* promove a produção de citocinas inflamatórias IL6, TNF e $IFN\gamma$ ($p < 0,001$) em todos os grupos. Isso mostra que a imunização com *TgHSP70* não é capaz de influenciar os níveis destas citocinas promovidos pela infecção (Figura 6B). Esses dados sugerem que a imunização com *TgHSP70* não é capaz de modificar o perfil de citocinas inflamatórias IL6, TNF e $IFN\gamma$ presentes no soro de camundongos infectados (Figura 6C).

10.3. *Tg*HSP70 induz elevada produção de anticorpos

Para avaliar o desenvolvimento da resposta humoral frente à imunização, o soro dos animais imunizados foi coletado e utilizado para dosagem de anticorpos por ELISA. Foi observado que somente camundongos imunizados com *Tg*HSP70 apresentaram títulos elevados de anticorpos IgG específicos contra a proteína, os quais foram significativamente maiores nos animais que receberam a proteína adsorvida em alúmen (Figura 7A). Além disso, estes animais também apresentaram

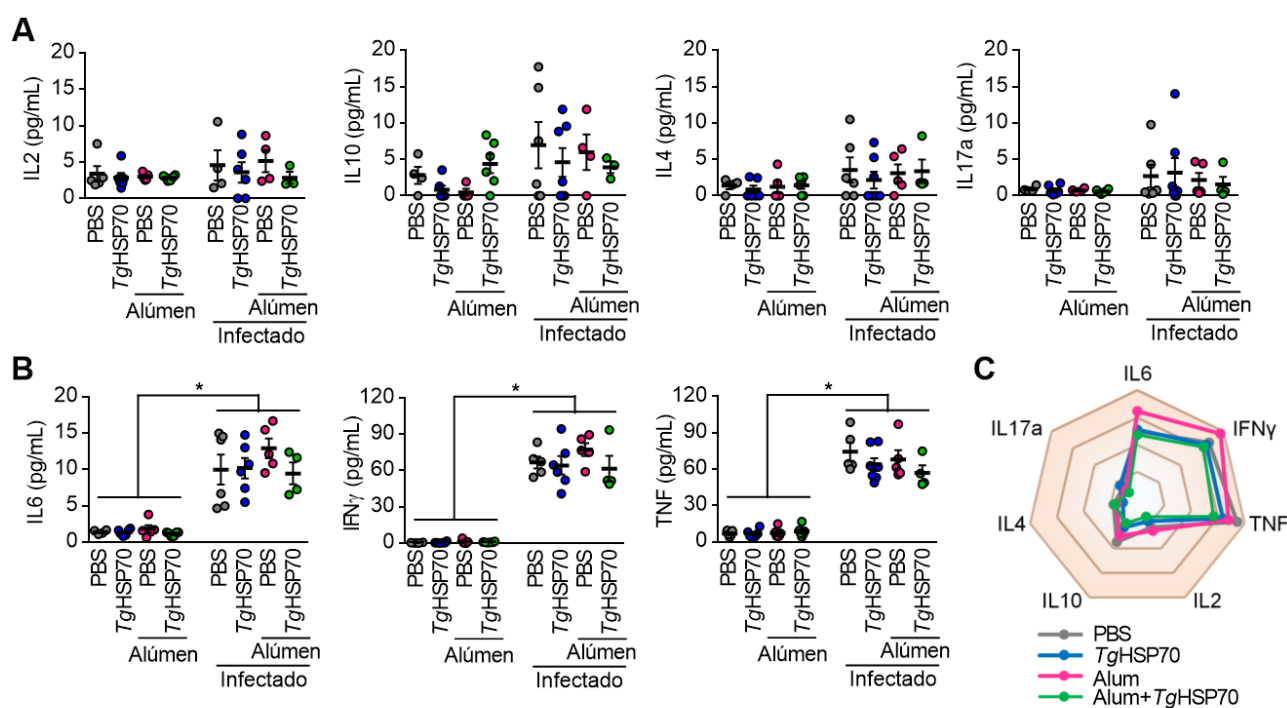


Figura 13. Imunização com *Tg*HSP70 não induz alteração do perfil de citocinas no soro de animais desafiados com *T. gondii*. O soro de camundongos imunizados com *Tg*HSP70 diluída em PBS ou adsorvida em alúmen foi coletado para análise de citocinas após 4 semanas de infecção. Foram avaliadas as citocinas IL2, IL10, IL4 e IL17a (**A**), bem como citocinas características da infecção por *T. gondii* IL6, IFN γ e TNF (**B**). (**C**) Gráfico de radar resumindo o perfil de citocinas presentes no soro mostradas em (**A**) e (**B**). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos 3 camundongos por grupo. *Tg*, Grupo infectado com *T. gondii*. * Teste *t* não-pareado, $p < 0,05$.

maiores títulos de anticorpos anti-STAg do que os animais injetados somente com PBS principalmente após 4 semanas de infecção (10^a semana de imunização) (Figura 7A). Observamos por *immunoblotting* que camundongos imunizados com TgHSP70 apresentaram forte detecção de uma banda correspondente ao peso de 70 kDa presente no STAg, independente da presença do adjuvante. Quatro semanas após a infecção, todos os grupos de imunização reconheceram as bandas

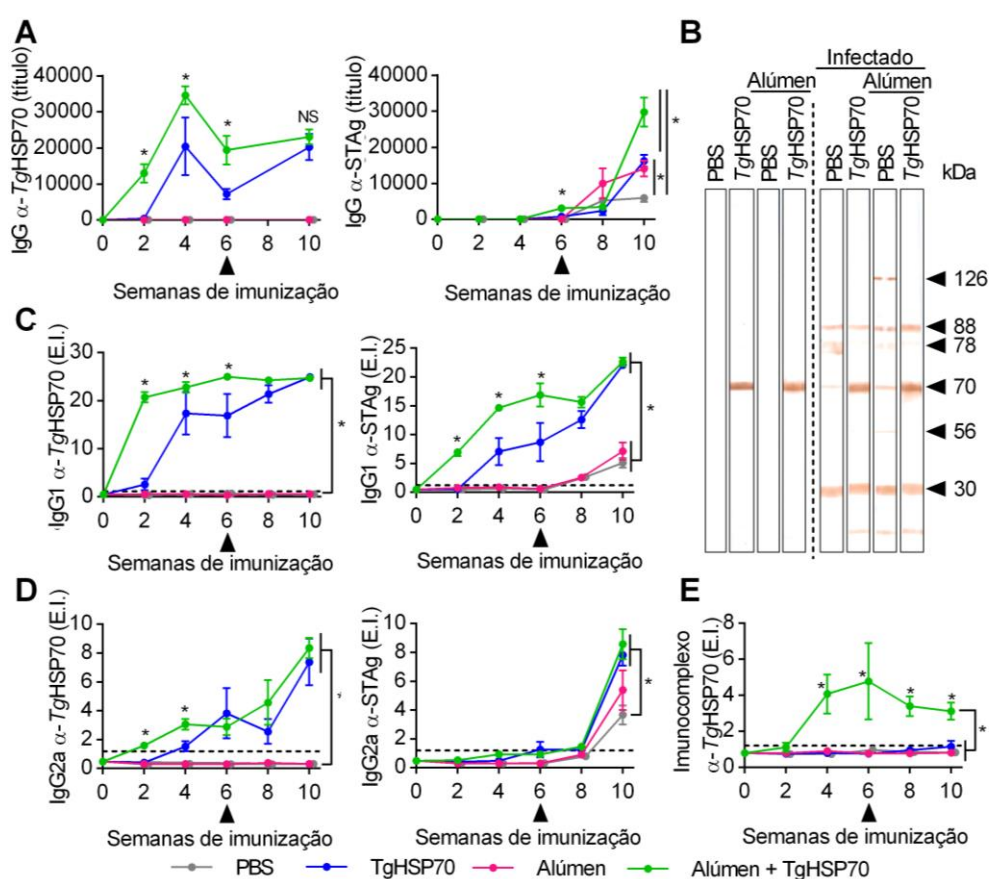


Figura 14. Imunização com TgHSP70 induz maior produção de anticorpos anti-STAg. O soro de camundongos imunizados com TgHSP70 diluída em PBS ou adsorvida em alúmen foi coletado para análise dos títulos de anticorpos. **(A)** Títulos de IgG total anti-TgHSP70 e anti-STAg. **(B)** Immunoblotting utilizando o soro de animais imunizados e/ou infectados para detecção de proteínas presentes no STAg. **(C e D)** Níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-TgHSP70 e anti-STAg. **(E)** Quantificação de imunocomplexos anti-TgHSP70. Setas pretas em **A, C, D e E** indicam a semana que os animais foram infectados. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos 3 camundongos por grupo. E.I., índice ELISA. Tg, Grupo infectado com *T. gondii*. * Teste *t* não-pareado, $p < 0,05$.

proteicas de 30, 70, 78 e 88 kDa, embora os animais injetados com alúmen reconheceram também proteínas de peso 56 e 126 kDa (Figura 7B).

Camundongos imunizados com *TgHSP70* também apresentaram elevados níveis de anticorpos IgG1 específicos anti-*TgHSP70* e anti-STAg, sendo estes níveis maiores em camundongos que receberam a proteína adsorvida em alúmen (Figura 7C). Este perfil foi similar para os níveis de IgG2a, os quais apresentaram menores quantidades de anticorpos em relação ao observado para IgG1 (Figura 7D). Nosso grupo demonstrou anteriormente que camundongos C57BL/6 cronicamente infectados não apresentam imunocomplexos (ICs) anti-*TgHSP70* no soro, como observado em camundongos BALB/c (BARENCO *et al.*, 2014). Assim, investigamos se a imunização seria capaz de induzir anticorpos que seriam capazes de capturar a *TgHSP70* circulante no soro destes animais e, conseqüentemente, formar ICs. Curiosamente, somente os animais imunizados com *TgHSP70* adsorvida em alúmen apresentaram níveis detectáveis de ICs anti-*TgHSP70* a partir da 4^a semana até a 10^a semana de imunização (Figura 7E). Estes resultados indicam que a imunização com *TgHSP70* induz elevada produção de anticorpos IgG1 específicos, independente da utilização de alúmen.

10.4. *TgHSP70* ativa e aumenta expressão de CD86 em linfócitos B

Visando entender o fenômeno de proteção nos camundongos imunizados com *TgHSP70*, as células do baço de camundongos imunizados foram coletadas após 6 semanas de imunização. A análise de proliferação de linfócitos do baço estimulados foi feita por citometria de fluxo utilizando CFSE, dentro da população de células isoladas (*Singlets*) (Figura 8A). Foi observado que o estímulo com *TgHSP70* somente foi capaz de estimular a proliferação de linfócitos B CD3⁺CD19⁺ (Figura 8B).

De fato, não foi observada a proliferação de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ de nenhuma das condições estimuladas com TgHSP70, independente do grupo de

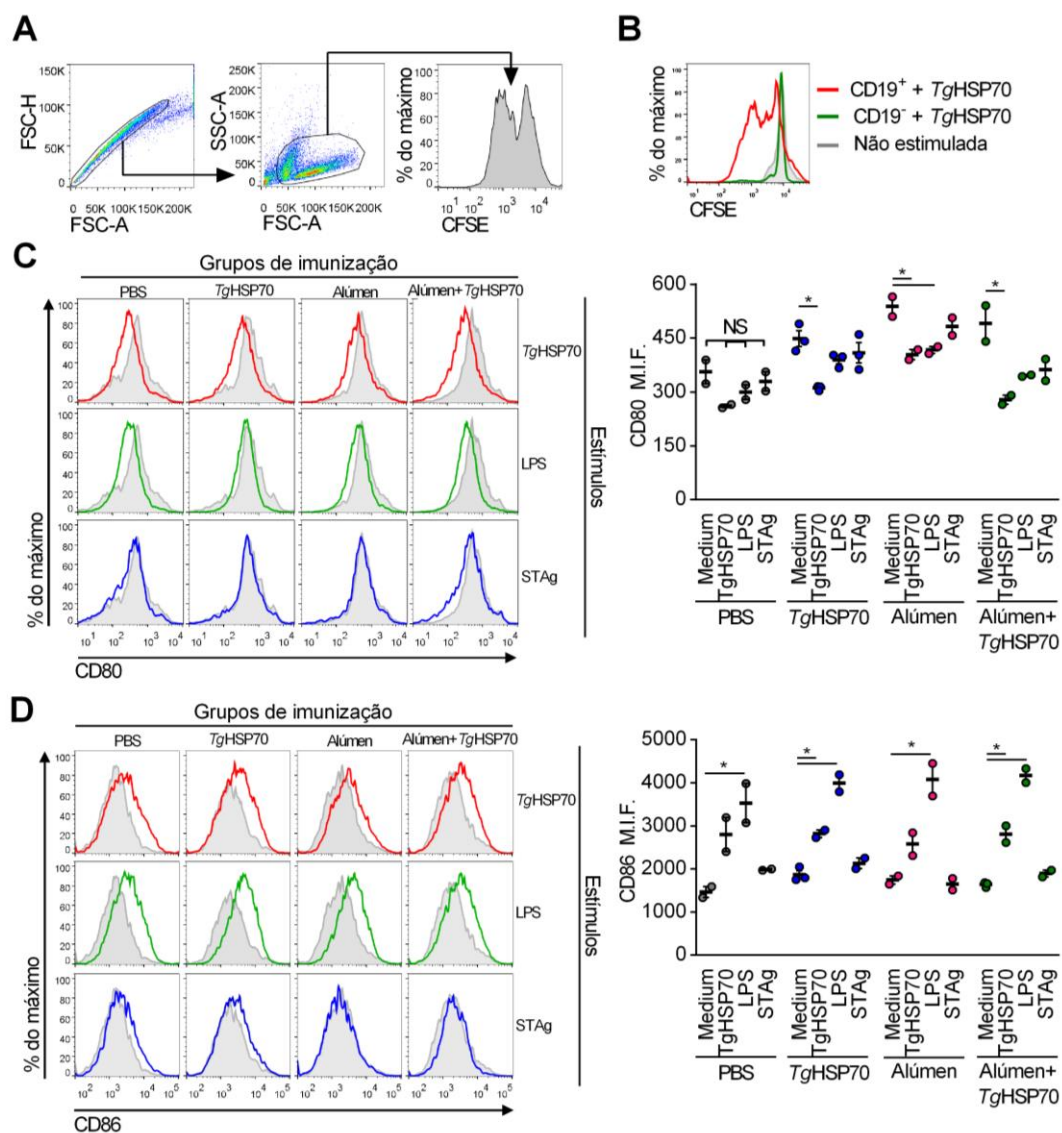


Figura 15. TgHSP70 estimula a proliferação de linfócitos B mediada pela molécula co-estimuladora CD86. Células do baço de camundongos imunizados com TgHSP70 diluída em PBS ou adsorvida em alúmen foram marcadas com CFSE 5 μ M e incubadas com estímulos (TgHSP70 10 μ g/mL, LPS 1 μ g/mL ou STAg 10 μ g/mL) por 72 horas. **(A)** As células foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo dentro da população isolada de linfócitos. **(B)** Análise da proliferação de células estimuladas com TgHSP70. **(C e D)** Análise da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 **(C)** e CD86 **(D)** em linfócitos B estimulados. Os dados são representativos de dois experimentos Tg independentes com pelo menos 3 camundongos por grupo. Tg, Grupo infectado com *T. gondii*. * Teste *t* não-pareado, $p < 0,05$.

imunização (Figura 9). Porém, *Tg*HSP70 promove a proliferação de células B CD19+ em níveis semelhantes, ou até maiores que o estímulo com LPS dependendo do grupo imunizado ($p < 0,01$, Figura 9). Além disso, o estímulo com *Tg*HSP70 não foi capaz de induzir a produção de IL10 nem IFN γ nas células do baço (Dados não mostrados).

Para entender melhor o mecanismo de ativação destas células por *Tg*HSP70, investigamos o papel dos marcadores CD80 e CD86 que estão intimamente relacionados com a proliferação e com a produção de anticorpos. De fato, o estímulo das células com *Tg*HSP70 reduz $32,7 \pm 8,8\%$ ($p < 0,05$) a expressão da molécula

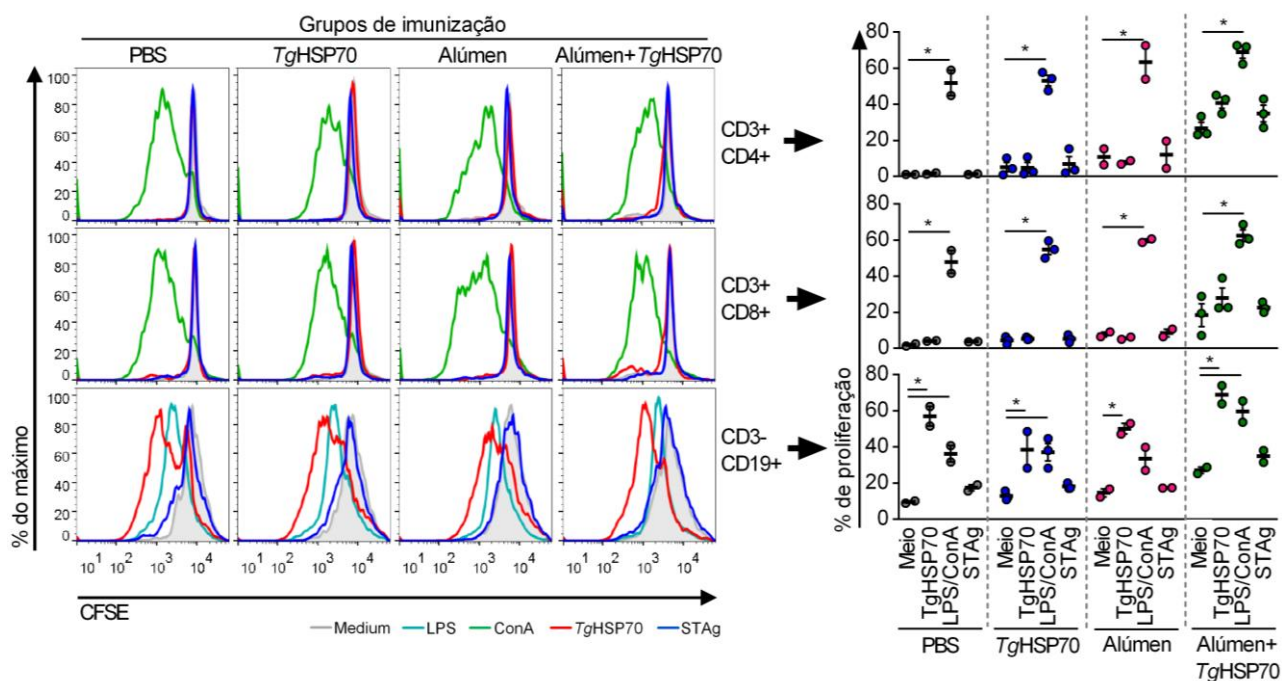


Figura 16. *Tg*HSP70 não estimula a proliferação de linfócitos T. Células do baço de camundongos imunizados com *Tg*HSP70 diluída em PBS ou adsorvida em alúmen foram marcadas com CFSE 5 μ M e incubadas com estímulos (*Tg*HSP70 10 μ g/mL, LPS 1 μ g/mL, ConA 2,5 μ g/mL ou STAg 10 μ g/mL) por 72 horas. As células foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo dentro da população isolada de linfócitos T CD3+CD4+ (superior), CD3+CD8+ (meio) e linfócitos B CD3-CD19+ (inferior). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos 3 camundongos por grupo. *Tg*, Grupo infectado com *T. gondii*. * Teste *t* não-pareado, $p < 0,05$.

inibitória CD80 de linfócitos B em todos os grupos imunizados, com exceção do grupo tratado com PBS no qual a redução não foi significativa (Figura 8C). Além disso, o estímulo com *TgHSP70* promoveu o aumento de $62,4 \pm 17,6\%$ na expressão da molécula co-estimuladora CD86 nos linfócitos B, com diferença estatística significativa nos grupos de animais imunizados com *TgHSP70* ($p < 0,01$, Figura 8D). Assim, estes resultados sugerem que a imunização com *TgHSP70* induz ativação de linfócitos B por via dependente de CD86, a qual é uma molécula fundamental para produção de anticorpo e manutenção da resposta humoral.

10.5. Anticorpos anti-*TgHSP70* não exercem função direta no parasita

Porque foi observado que animais imunizados com *TgHSP70* apresentavam baixa carga parasitária no cérebro, hipotetizamos que os anticorpos presentes no soro destes animais poderiam ser capazes de participar de uma resposta contra a infecção por *T. gondii*.

Levando em consideração que a *TgHSP70* é citoplasmática (WEISS *et al.*, 1998; DOBBIN; SMITH; JOHNSON, 2002), imaginamos que o mecanismo efetor de anticorpos anti-*TgHSP70* não é mediado pela interação direta com o parasita. Precisamente, soros normais ou inativados pelo calor de camundongos imunizados com *TgHSP70* não inibiram a replicação de parasitas RH 2F1 em cultivo de fibroblastos, como foi observado na cultura tratada com soro de camundongos infectados (Figura 10A). Além disso, o soro dos animais imunizados não foi capaz de lisar taquizoítas RH 2F1 como observado com o soro de animais infectados, independente do grupo de imunização (Figura 10B). De fato, os anticorpos anti-*TgHSP70* presentes no soro de camundongos imunizados não foi capaz de se ligar na superfície de taquizoítas (Figura 10C). Estes dados sugerem que anticorpos anti-

TgHSP70 não controlam a replicação do parasita pela neutralização nem promovem a lise mediada por complemento através da interação com o parasita.

10.6. Anticorpos anti-*TgHSP70* previnem a produção de NO induzida por *TgHSP70*

Estudos anteriores mostraram o papel da *TgHSP70* na modulação da produção de NO em macrófagos peritoneais (MUN *et al.*, 2005). Assim, avaliamos o papel dos anticorpos anti-*TgHSP70* de animais imunizados na neutralização dessa atividade de *TgHSP70*. Macrófagos de camundongos da linhagem RAW264.7 foram incubados com 2,5% de soro murino de animais imunizados e diferentes concentrações de *TgHSP70* por 72 horas. Foi observado que as células

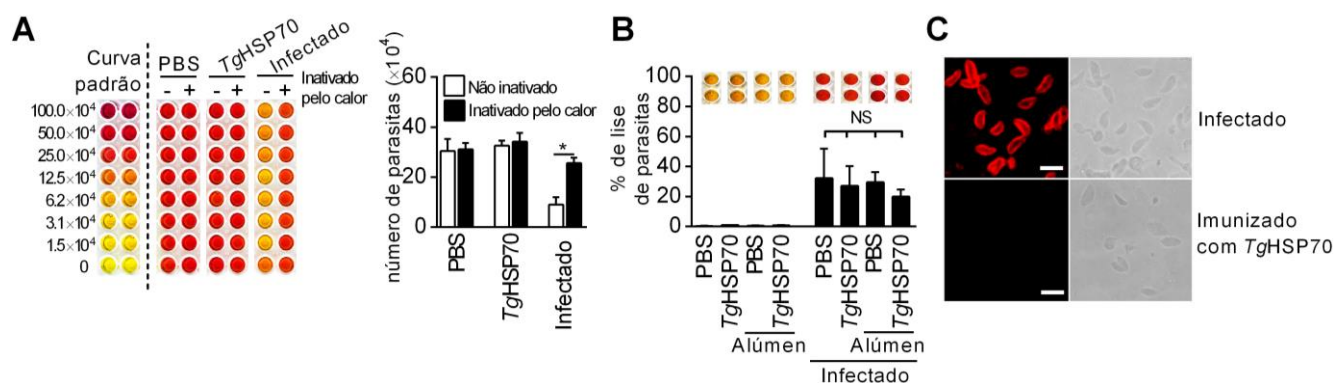


Figura 17. Anticorpos anti-*TgHSP70* não inibem ou promovem lise mediada pelo complemento através da ligação direta ao parasita. **(A)** Taquizoítas da cepa RH 2F1 foram ressuspensos em meio contendo 5% de soro inativado, ou não, de camundongos imunizados com *TgHSP70* e/ou infectados. Estes parasitas foram utilizados para infectar fibroblastos NIH por 24 horas para quantificação do parasitismo pelo ensaio de β -galactosidase (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996). **(B)** Ensaio de lise mediada pelo complemento utilizando soro de animais imunizados e/ou infectados. **(C)** Imunofluorescência usando soros de animais imunizados com *TgHSP70* ou infectados em taquizoítas da cepa RH 2F1. As barras de escala representam 10 μ m. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (n=8). *Teste *t* não-pareado, $P < 0,05$.

suplementadas com soro de animais imunizados não reduziram a produção de NO induzida pelo antígeno, independente dos soros ou da concentração de antígeno utilizados (Figura 11). Juntos, estes resultados sugerem o papel dos anticorpos anti-*TgHSP70* na neutralização de *TgHSP70* livre para prevenir a produção de NO em células RAW264.7.

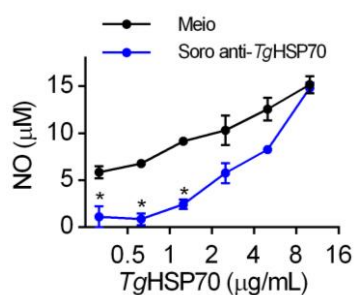


Figura 18. Anticorpos anti-*TgHSP70* previnem a produção de NO induzida por *TgHSP70*. (A) Células RAW264.7 foram incubadas por 72 horas com meio contendo 2,5% de soro de animais imunizados misturados com *TgHSP70* em diferentes concentrações (10 a 0,31 µg/mL, fator de diluição 2) para quantificação de NO pelo método de Griess. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (n=6). *Teste *t* não-pareado, P<0,05.

11. DISCUSSÃO (CAPÍTULO II)

Publicações anteriores mostraram que uma única imunização de camundongos C57BL/6 com 100 µg *TgHSP70*, emulsificada em adjuvante completo de Freund 10 dias antes da infecção com a cepa Fukaya, aumenta o número de cistos no cérebro (MUN; AOSAI; YANO, 1999; MUN *et al.*, 2000b). Em nosso estudo, imunizamos camundongos C57BL/6 com 10 vezes menos *TgHSP70*, diluída em PBS ou adsorvida em alumínio 6 semanas antes da infecção com a cepa ME49. Estas diferenças observadas provavelmente sejam devido a diferentes metodologias utilizadas nos protocolos de imunização, na qual após 6 semanas de infecção a resposta imune adaptativa do camundongo contra o antígeno seja mais eficiente, visto que com 2 semanas de imunização os animais do grupo *TgHSP70* ainda não possuíam quantidades elevadas de anticorpos. Nossos resultados corroboram com a literatura, visto que a imunização com a proteína HSP70 de outros microorganismos é capaz de gerar resposta protetora em camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e *Naegleria fowleri* (SONG *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2013).

Recentemente, foi mostrado que a imunização com plasmídeo contendo *TgHSP70* é capaz de gerar resposta imune protetora mediada por linfócitos T CD8⁺ através da via Fas/FasL, consequentemente reduzindo o número de cistos cerebrais (CHU *et al.*, 2014). Mostramos que a imunização com a proteína *TgHSP70* não é capaz de induzir diretamente a proliferação de linfócitos T, sejam eles CD4⁺ ou CD8⁺. Foi observado anteriormente que tanto a HSP70 murina quanto a *TgHSP70* são capazes de ativar células por via dependente de TLR4 e TLR2 expressos em células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, mas não linfócitos T (AOSAI *et al.*, 2002; ASEA *et al.*, 2002; VABULAS *et al.*, 2002; MUN *et al.*, 2005; AOSAI *et al.*, 2006; GONG *et al.*, 2009).

Mostramos também que a *TgHSP70* é capaz induzir a ativação de células B. Estas, por sua vez, desenvolvem um papel crucial na produção de anticorpos contra *T. gondii*, uma vez que a infecção de camundongos μ MT (deficientes em células B funcionais) são mais susceptíveis a infecção (KANG; REMINGTON; SUZUKI, 2000; JOHNSON; SAYLES, 2002). Elas também são essenciais na geração de imunidade protetora durante a infecção, visto que camundongos μ MT imunizados não são protegidos por vacinas como os camundongos controles (SAYLES; GIBSON; JOHNSON, 2000; JOHNSON *et al.*, 2004). Apesar de trabalhos já terem mostrado o papel da *TgHSP70* na ativação de linfócitos B e indução de anticorpos (CHEN *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2003), nossos resultados mostraram que a ativação de células B por *TgHSP70* é mediada pelo aumento da expressão de CD86 em detrimento de CD80. A estimulação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) com HSP70 murina promove o aumento na expressão da molécula co-estimuladora CD86, mas não CD80 nem CD40 (BASU *et al.*, 2000). Porém, o estímulo de BMDCs com *TgHSP70* foi capaz de estimular a expressão de todos os marcadores CD86, CD80 e CD40 (KANG, H. K. *et al.*, 2004; AOSAI *et al.*, 2006).

Recentemente demonstramos que a *TgHSP70* é uma proteína encontrada no soro de animais infectados e pode ser utilizada como um marcador de susceptibilidade do animal frente a infecção por *T. gondii*. Além disso, mostramos também que camundongos C57BL/6 não produzem quantidades suficientes de anticorpos IgG anti-*TgHSP70* capazes de formar imunocomplexos com *TgHSP70* (BARENCO *et al.*, 2014). Os imunocomplexos, por sua vez, modulam a resposta inflamatória de macrófagos, os quais passam a produzir altos níveis de IL10 em detrimento de IL12 (AMBARUS *et al.*, 2012). Mostramos que camundongos imunizados com *TgHSP70*, quando infectados, produzem elevada quantidade de

anticorpos IgG anti-*Tg*HSP70 e isso pode estar correlacionado com a proteção observada nestes animais.

Mostramos que a produção de IgG anti-*Tg*HSP70 não está associada com a inibição da infecção ou lise do parasita pela ligação direta de anticorpos na superfície do parasita. Isto corrobora com a literatura, uma vez que ela é uma proteína primariamente intracelular (WEISS *et al.*, 1998). Foi demonstrado que a *Tg*HSP70 pode desencadear uma cascata de sinalização via TLR2, e induzir a tolerância em macrófagos peritoneais ativados com outros estímulos pela via TLR4/MyD88 (MUN *et al.*, 2005). A formação de imunocomplexos depende de concentrações equivalentes de antígeno e anticorpo (CRUSE; LEWIS, 2010). Em nosso estudo, porque fizemos a diluição do soro no meio de cultura para mimetizar a neutralização da *Tg*HSP70, talvez as concentrações de anticorpos não favorecem a formação de ICs em meio líquido. Porém, outro trabalho sugere que a *Tg*HSP70 pode aderir a membrana de células mortas (DOBBIN; SMITH; JOHNSON, 2002), embora esta via ainda precisa ser investigada.

Estes resultados mostram que a imunização com *Tg*HSP70, independente do uso de alúmen como adjuvante, reduz a quantidade de cistos cerebrais, funcionando como um bom candidato para o desenvolvimento de vacinas (VERMA; KHANNA, 2013). Demonstramos que camundongos imunizados com *Tg*HSP70 apresentaram proliferação de células B e elevada produção de anticorpos anti-*Tg*HSP70, os quais não se ligam diretamente ao parasita, mas são capazes de neutralizar *Tg*HSP70 livre e prevenir a indução de tolerância em células RAW264.7 (Figura 12). Por fim, estes resultados reforçam o desenvolvimento de vacinas utilizando moléculas imunomodulatórias para o controle da toxoplasmose.

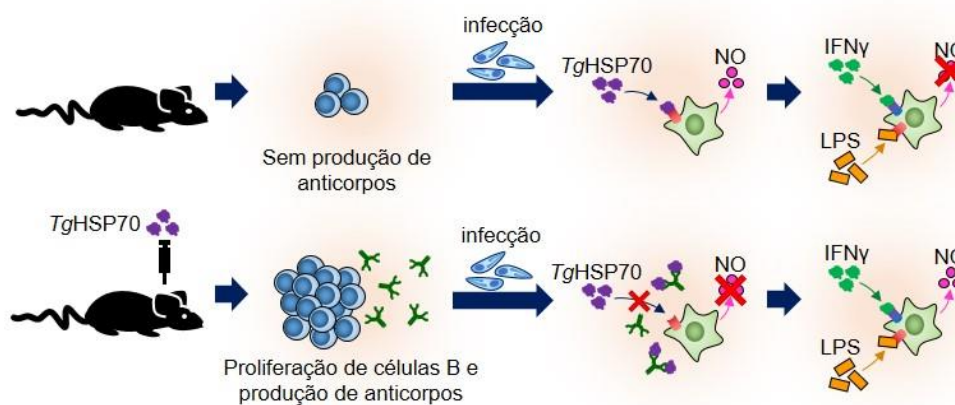


Figura 19. Imunização com *TgHSP70* reduz a produção de NO em macrófagos induzida por *TgHSP70*. Camundongos não imunizados respondem contra a *TgHSP70* produzindo NO e depois falham em responder a outros estímulos, como LPS e IFN γ (MUN *et al.*, 2005). Em contrapartida, animais imunizados com *TgHSP70* apresentam elevados níveis de anticorpos capazes de neutralizar *TgHSP70* livre que poderia modular macrófagos, os quais respondem a outros estímulos posteriores.

12. CONCLUSÕES GERAIS

- O tratamento com STAg protege contra a inflamação do intestino provocada pela infecção aguda de *T. gondii* pela modulação de citocinas, manutenção da função da barreira epitelial e das células de Paneth, além de prevenir desregulação da microbiota pela secreção de IgA no lúmen intestinal.
- A imunização com TgHSP70 protege contra a infecção crônica pela cepa tipo II ME49 de *T. gondii* por uma via dependente de anticorpo que é auxiliada pelo uso de adjuvante alúmen.
- Estes resultados fortalecem e incentivam o uso de antígenos imunomoduladores de *T. gondii*, como o STAg e a TgHSP70, como ferramentas para controle de doenças inflamatórias intestinais e para vacinação.

REFERENCIAS

1. AMBARUS, C. A.; SANTEGOETS, K. C.; VAN BON, L.; WENINK, M. H.; TAK, P. P.; RADSTAKE, T. R.; BAETEN, D. L. Soluble immune complexes shift the TLR-induced cytokine production of distinct polarized human macrophage subsets towards IL-10. **PloS One**, v. 7, p. e35994, 2012.
2. AMORIM, A. G.; CARRINGTON, M.; MILES, M. A.; BARKER, D. C.; DE ALMEIDA, M. L. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. **Cell Stress and Chaperones**, v. 1, p. 177-187, 1996.
3. AOSAI, F.; CHEN, M.; KANG, H. K.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; PIAO, L. X.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; YANO, A. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein HSP70 functions as a B cell mitogen. **Cell Stress and Chaperones**, v. 7, p. 357-364, 2002.
4. AOSAI, F.; RODRIGUEZ PENA, M. S.; MUN, H. S.; FANG, H.; MITSUNAGA, T.; NOROSE, K.; KANG, H. K.; BAE, Y. S.; YANO, A. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. **Cell Stress and Chaperones**, v. 11, p. 13-22, 2006.
5. ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J. A.; BARE, O.; AURON, P. E.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15028-15034, 2002.
6. BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; PENA, J. D.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, p. 624-630, 2007.
7. BARENCO, P. V.; LOURENCO, E. V.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, D. A.; ARAUJO, E. C.; COUTINHO, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. *Toxoplasma gondii* 70 kDa heat shock protein: systemic detection is associated with the death of the parasites by the immune response and its increased expression in the brain is associated with parasite replication. **PloS One**, v. 9, p. e96527, 2014.
8. BARMAN, M.; UNOLD, D.; SHIFLEY, K.; AMIR, E.; HUNG, K.; BOS, N.; SALZMAN, N. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 907-915, 2008.

9. BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 426-430, 2003.
10. BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v. 133, p. 421-432, 2006.
11. BASU, S.; BINDER, R. J.; SUTO, R.; ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. **International Immunology**, v. 12, p. 1539-1546, 2000.
12. 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. 8, p. e75138, 2013.
13. BENSON, A.; PIFER, R.; BEHRENDT, C. L.; HOOPER, L. V.; YAROVINSKY, F. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. **Cell Host Microbe**, v. 6, p. 187-196, 2009.
14. BRANDL, K.; RUTSCHMANN, S.; LI, X.; DU, X.; XIAO, N.; SCHNABL, B.; BRENNER, D. A.; BEUTLER, B. Enhanced sensitivity to DSS colitis caused by a hypomorphic *Mbtps1* mutation disrupting the ATF6-driven unfolded protein response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 3300-3305, 2009.
15. CHEN, M.; AOSAI, F.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; HATA, H.; YANO, A. Anti-HSP70 autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4893-4899, 2000.
16. CHEN, M.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; MUN, H. S.; YANO, A. The role of anti-HSP70 autoantibody-forming V(H)1-J(H)1 B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **International Immunology**, v. 15, p. 39-47, 2003.
17. CHU, D.; MORODA, M.; PIAO, L. X.; AOSAI, F. CTL induction by DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-HSP70 gene. **Parasitology International**, v. 63, p. 408-416, 2014.

18. CONG, Y.; FENG, T.; FUJIHASHI, K.; SCHOEB, T. R.; ELSON, C. O. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 19256-19261, 2009.

19. CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. 2. Totowa: Humana Press, 2009. ISBN 1940-6029.

20. CRUSE, J. C.; LEWIS, R. E. Antigen-antibody interactions. In: CRUSE, J. C.; LEWIS, R. E. (Ed.). **Atlas of Immunology**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p.285-306.

21. DANDO, C.; GABRIEL, K. E.; REMINGTON, J. S.; PARMLEY, S. F. Simple and efficient method for measuring anti-*Toxoplasma* immunoglobulin antibodies in human sera using complement-mediated lysis of transgenic tachyzoites expressing beta-galactosidase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2122-2125, 2001.

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

23. DOBBIN, C. A.; SMITH, N. C.; JOHNSON, A. M. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 958-965, 2002.

24. DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v. 84, p. 933-939, 1996.

25. DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 318.

26. 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.

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

28. EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, p. 668-675, 2012.
29. EISENBARTH, S. C.; COLEGIO, O. R.; O'CONNOR, W.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v. 453, p. 1122-1126, 2008.
30. ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol**, v. 26, p. 190-196, 2010.
31. ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**, v. 122, p. 335-353, 2008.
32. FANG, H.; AOSAI, F.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; AHMED, A. K.; FURUYA, M.; YANO, A. Anaphylactic reaction induced by *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. **International Immunology**, v. 18, p. 1487-1497, 2006.
33. FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 443-457, 2002.
34. FLACH, T. L.; NG, G.; HARI, A.; DESROSIERS, M. D.; ZHANG, P.; WARD, S. M.; SEAMONE, M. E.; VILAYSANE, A.; MUCSI, A. D.; FONG, Y.; PRENNER, E.; LING, C. C.; TSCHOPP, J.; MURUVE, D. A.; AMREIN, M. W.; SHI, Y. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. **Nature Medicine**, v. 17, p. 479-487, 2011.
35. FOGED, C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. **Therapeutic Delivery**, v. 2, p. 1057-1077, 2011.
36. FOUREAU, D. M.; MIELCARZ, D. W.; MENARD, L. C.; SCHULTHESS, J.; WERTS, C.; VASSEUR, V.; RYFFEL, B.; KASPER, L. H.; BUZONI-GATEL, D. TLR9-dependent induction of intestinal alpha-defensins by *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 7022-7029, 2010.

37. FREHN, L.; JANSEN, A.; BENNEK, E.; MANDIC, A. D.; TEMIZEL, I.; TISCHENDORF, S.; VERDIER, J.; TACKE, F.; STREETZ, K.; TRAUTWEIN, C.; SELLGE, G. Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. **PloS One**, v. 9, p. e106750, 2014.
38. FU, F.; TIAN, H.; LI, X.; LANG, Y.; TONG, G.; LIU, S.; LI, H.; WANG, W.; LI, X.; CHEN, X. C-terminal heat shock protein 70 of *Mycobacterium tuberculosis* as a molecular adjuvant for DNA vaccination with the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice. **Veterinary Journal**, v. 195, p. 244-247, 2013.
39. FURUTA, T.; KIKUCHI, T.; AKIRA, S.; WATANABE, N.; YOSHIKAWA, Y. Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. **International Immunology**, v. 18, p. 1655-1662, 2006.
40. FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, R. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, D.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6392-6401, 2003.
41. GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews: Immunology**, v. 3, p. 710-720, 2003.
42. GAVIN, A. L.; HOEBE, K.; DUONG, B.; OTA, T.; MARTIN, C.; BEUTLER, B.; NEMAZEE, D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. **Science**, v. 314, p. 1936-1938, 2006.
43. GAY, N. J.; GANGLOFF, M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 141-165, 2007.
44. GAZZINELLI, R.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 175-180, 1992.
45. GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 286-292, 1991.

46. GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 798-805, 1996.
47. GE, F. F.; QIU, Y. F.; GAO, X. F.; YANG, Y. W.; CHEN, P. Y. Fusion expression of major antigenic segment of JEV E protein-hsp70 and the identification of domain acting as adjuvant in hsp70. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 288-296, 2006.
48. GERSEMANN, M.; STANGE, E. F.; WEHKAMP, J. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, p. 3198-3203, 2011.
49. GONG, J.; ZHU, B.; MURSHID, A.; ADACHI, H.; SONG, B.; LEE, A.; LIU, C.; CALDERWOOD, S. K. T cell activation by heat shock protein 70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1. **Journal of Immunology**, v. 183, p. 3092-3098, 2009.
50. GROSS, U. [Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v. 47, p. 692-697, 2004.
51. GUO, X.; XIA, X.; TANG, R.; ZHOU, J.; ZHAO, H.; WANG, K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 367-373, 2008.
52. HAPFELMEIER, S.; LAWSON, M. A.; SLACK, E.; KIRUNDI, J. K.; STOEL, M.; HEIKENWALDER, M.; CAHENZLI, J.; VELYKOREDKO, Y.; BALMER, M. L.; ENDT, K.; GEUKING, M. B.; CURTISS, R., 3RD; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. **Science**, v. 328, p. 1705-1709, 2010.
53. HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H. K.; DUNAY, I. R.; MOTER, A.; GESCHER, D. M.; SCHUMANN, R. R.; GOBEL, U. B.; LIESENFELD, O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 8785-8795, 2006.

54. JIANG, Q.; FU, B.; CHEN, Y.; WANG, Y.; LIU, H. Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6043-6050, 2013.
55. JOHNSON, L. L.; LANTHIER, P.; HOFFMAN, J.; CHEN, W. Vaccination protects B cell-deficient mice against an oral challenge with mildly virulent *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v. 22, p. 4054-4061, 2004.
56. JOHNSON, L. L.; SAYLES, P. C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 185-191, 2002.
57. JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis -recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10-25, 2010.
58. JU, C. H.; CHOCKALINGAM, A.; LEIFER, C. A. Early response of mucosal epithelial cells during *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v. 183, p. 7420-7427, 2009.
59. KANG, H.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 2629-2634, 2000.
60. KANG, H. K.; LEE, H. Y.; LEE, Y. N.; JO, E. J.; KIM, J. I.; AOSAI, F.; YANO, A.; KWAK, J. Y.; BAE, Y. S. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, p. 899-904, 2004.
61. KANG, K. M.; LEE, G. S.; LEE, J. H.; CHOI, I. W.; SHIN, D. W.; LEE, Y. H. Effects of iNOS inhibitor on IFN-gamma production and apoptosis of splenocytes in genetically different strains of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Korean Journal of Parasitology**, v. 42, p. 175-183, 2004.
62. KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. Inflammatory bowel disease. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 573-621, 2010.
63. KATO, L. M.; KAWAMOTO, S.; MARUYA, M.; FAGARASAN, S. Gut TFH and IgA: key players for regulation of bacterial communities and immune homeostasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 92, p. 49-56, 2014.

64. KHAN, I. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 13955-13960, 1997.
65. KIKUMURA, A.; FANG, H.; MUN, H. S.; UEMURA, N.; MAKINO, M.; SAYAMA, Y.; NOROSE, K.; AOSAI, F. Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in *Toxoplasma gondii*-infected mice by DNA vaccination with *T. gondii*-derived heat shock protein 70 gene. **Parasitology International**, v. 59, p. 105-111, 2010.
66. KOBLANSKY, A. A.; JANKOVIC, D.; OH, H.; HIENY, S.; SUNGNAK, W.; MATHUR, R.; HAYDEN, M. S.; AKIRA, S.; SHER, A.; GHOSH, S. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 38, p. 119-130, 2013.
67. KOCH, S.; NUSRAT, A. The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. **Annual Review of Pathology**, v. 7, p. 35-60, 2012.
68. LIESENFELD, O.; KANG, H.; PARK, D.; NGUYEN, T. A.; PARKHE, C. V.; WATANABE, H.; ABO, T.; SHER, A.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 365-376, 1999.
69. LIESENFELD, O.; KOSEK, J.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 597-607, 1996.
70. LIU, R. Y.; LI, X.; LI, L.; LI, G. C. Expression of human hsp70 in rat fibroblasts enhances cell survival and facilitates recovery from translational and transcriptional inhibition following heat shock. **Cancer Research**, v. 52, p. 3667-3673, 1992.
71. LIU, T.; DANIELS, C. K.; CAO, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, p. 354-374, 2012.

72. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
73. MA, G. Y.; ZHANG, J. Z.; YIN, G. R.; ZHANG, J. H.; MENG, X. L.; ZHAO, F. *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 41-46, 2009.
74. MAKINO, M.; UEMURA, N.; MORODA, M.; KIKUMURA, A.; PIAO, L. X.; MOHAMED, R. M.; AOSAI, F. Innate immunity in DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene that induces DC activation and Th1 polarization. **Vaccine**, v. 29, p. 1899-1905, 2011.
75. MBOW, M. L.; DE GREGORIO, E.; VALIANTE, N. M.; RAPPUOLI, R. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 411-416, 2010.
76. MOHAMED, R. M.; AOSAI, F.; CHEN, M.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; BELAL, U. S.; PIAO, L. X.; YANO, A. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. **Vaccine**, v. 21, p. 2852-2861, 2003.
77. MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
78. MULLER, C. A.; AUTENRIETH, I. B.; PESCHEL, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1297-1307, 2005.
79. MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; HATA, H.; TAGAWA, Y. I.; IWAKURA, Y.; BYUN, D. S.; YANO, A. *Toxoplasma gondii* Hsp70 as a danger signal in *toxoplasma gondii*-infected mice. **Cell Stress and Chaperones**, v. 5, p. 328-335, 2000a.
80. MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; PIAO, L. X.; FANG, H.; AKIRA, S.; YANO, A. Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4634-4642, 2005.
81. MUN, H. S.; AOSAI, F.; YANO, A. Role of *Toxoplasma gondii* HSP70 and *Toxoplasma gondii* HSP30/bag1 in antibody formation and prophylactic immunity in

mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Immunology**, v. 43, p. 471-479, 1999.

82. MUN, H. S.; NOROSE, K.; AOSAI, F.; CHEN, M.; YANO, A. A role of carboxy-terminal region of *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 in enhancement of *T. gondii* infection in mice. **Korean Journal of Parasitology**, v. 38, p. 107-110, 2000b.

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

84. O'HAGAN, D. **Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols**. New Jersey: Human Press, 2000. 342.

85. OUELLETTE, A. J. Paneth cell alpha-defensins in enteric innate immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2215-2229, 2011.

86. PARK, I. K.; QIAN, D.; KIEL, M.; BECKER, M. W.; PIHALJA, M.; WEISSMAN, I. L.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 423, p. 302-305, 2003.

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

88. POTTEN, C. S.; BOOTH, C.; PRITCHARD, D. M. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 78, p. 219-243, 1997.

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

90. RAETZ, M.; HWANG, S. H.; WILHELM, C. L.; KIRKLAND, D.; BENSON, A.; STURGE, C. R.; MIRPURI, J.; VAISHNAVA, S.; HOU, B.; DEFRANCO, A. L.; GILPIN, C. J.; HOOPER, L. V.; YAROVINSKY, F. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells. **Nature Immunology**, v. 14, p. 136-142, 2013.

91. REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R. N.; SHER, A. In vivo microbial stimulation induces

rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, p. 1819-1829, 1997.

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

93. ROTH, S.; FRANKEN, P.; SACCHETTI, A.; KREMER, A.; ANDERSON, K.; SANSOM, O.; FODDE, R. Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury. **PloS One**, v. 7, p. e38965, 2012.

94. SANTAOLALLA, R.; ABREU, M. T. Innate immunity in the small intestine. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 28, p. 124-129, 2012.

95. SAWADA, M.; TAKAHASHI, K.; SAWADA, S.; MIDORIKAWA, O. Selective killing of Paneth cells by intravenous administration of dithizone in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 72, p. 407-421, 1991.

96. SAYLES, P. C.; GIBSON, G. W.; JOHNSON, L. L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1026-1033, 2000.

97. SCHLUTER, D.; DECKERT-SCHLUTER, M.; LORENZ, E.; MEYER, T.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 3512-3518, 1999.

98. SHERMAN, M. P.; BENNETT, S. H.; HWANG, F. F.; SHERMAN, J.; BEVINS, C. L. Paneth cells and antibacterial host defense in neonatal small intestine. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 6143-6146, 2005.

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

100. SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1

expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 167-177, 2010.

101. SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 65-72, 2009.

102. SNIPPERT, H. J.; VAN DER FLIER, L. G.; SATO, T.; VAN ES, J. H.; VAN DEN BORN, M.; KROON-VEENBOER, C.; BARKER, N.; KLEIN, A. M.; VAN RHEENEN, J.; SIMONS, B. D.; CLEVERS, H. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. **Cell**, v. 143, p. 134-144, 2010.

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

104. SOUSA, L. A. **Mecanismos protetores induzidos pelo tratamento prévio com antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados oralmente por *Toxoplasma gondii*.** 2013. 63 (Mestrado). Laboratório de Imunopatologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

105. SROKA, J.; WOJCIK-FATLA, A.; DUTKIEWICZ, J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 13, p. 169-175, 2006.

106. STILLS, H. F., JR. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR J**, v. 46, p. 280-293, 2005.

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

108. 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.

109. TIAN, H.; BIEHS, B.; WARMING, S.; LEONG, K. G.; RANGELL, L.; KLEIN, O. D.; DE SAUVAGE, F. J. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. **Nature**, v. 478, p. 255-259, 2011.
110. TSUJI, M.; KOMATSU, N.; KAWAMOTO, S.; SUZUKI, K.; KANAGAWA, O.; HONJO, T.; HORI, S.; FAGARASAN, S. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. **Science**, v. 323, p. 1488-1492, 2009.
111. UTO, T.; TSUJIMURA, K.; UCHIJIMA, M.; SETO, S.; NAGATA, T.; SUDA, T.; CHIDA, K.; NAKAMURA, H.; KOIDE, Y. A novel vaccine strategy to induce *Mycobacterial* antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 61, p. 189-196, 2011.
112. VABULAS, R. M.; AHMAD-NEJAD, P.; GHOSE, S.; KIRSCHNING, C. J.; ISSELS, R. D.; WAGNER, H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15107-15112, 2002.
113. VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, p. 142, 2006.
114. VERMA, R.; KHANNA, P. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: A global challenge. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, p. 291-293, 2013.
115. WANG, S.; FANG, Z.; HUANG, X.; LUO, X.; FANG, Z.; GONG, N.; MING, C. The soluble tachyzoite antigen of *Toxoplasma gondii* has a protective effect on mouse allografts. **Transplantation Proceedings**, v. 45, p. 677-683, 2013.
116. WEISS, L. M.; KIM, K. ***Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan***. London: Elsevier, 2007. 778.
117. WEISS, L. M.; MA, Y. F.; TAKVORIAN, P. M.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 3295-3302, 1998.
118. XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, p. 427-434, 2007.

119. YAN, K. S.; CHIA, L. A.; LI, X.; OOTANI, A.; SU, J.; LEE, J. Y.; SU, N.; LUO, Y.; HEILSHORN, S. C.; AMIEVA, M. R.; SANGIORGI, E.; CAPECCHI, M. R.; KUO, C. J. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 466-471, 2012.
120. YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews: Immunology**, v. 14, p. 109-121, 2014.

ANEXO 1

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

ANÁLISE FINAL Nº 023/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 106/10

Projeto Pesquisa: “Papel da proteína Hsp70 e/ou SAG-1 de *Toxoplasma gondii* incorporadas em lipossomas, ou Hsp70 com adjuvantes ou CpG como antígenos vacinais no controle da toxoplasmose congênita em camundongos BALB/c e C57BL/6”.

Pesquisador Responsável: Neide Maria da Silva

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 29 de março de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU